Rhizocticin
Ein neues Antibiotikum aus Bacillus subtilis ATCC 6633

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universtität Tübingen

vorgelegt von
MARTIN KUGLER
aus Plochingen

1986

Rhizocticin
Ein neues Antibiotikum aus Bacillus subtilis ATCC 6633

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universtität Tübingen

vorgelegt von
MARTIN KUGLER
aus Plochingen

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 24. November 1986
Dekan: Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Loeffler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zähner

Meinen Eltern

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. W. Loeffler am Institut für Biologie II der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt. Ihm gilt für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft mein besonderer Dank.

Herzlichen Dank schulde ich Herrn Professor Dr. H. Zähner für sein stetiges Interesse, Unterstützung und hilfreiche Diskussionen.

Bei Herrn Professor Dr. G. Jung und seiner Arbeitsgruppe, Organisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen, möchte ich mich für die tätige Förderungung meiner Arbeit und gute interdisziplinäre Zusammenarbeit bedanken. Für die Überlassung der chemischen Daten und die Strukturaufklärung von Rhizocticin I und II sowie eines weiteren gegen *Paecilomyces variotii* aktiven Wirkstoffes, von unseren Arbeitsgruppen jetzt Rhizocticin III genannt, danke ich Herrn Diplom-Chemiker C. Rapp und Herrn Dr. Dr. A. Kern (siehe Anhang).

Frau E. Knorpp danke ich für die stets gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Dankbar bin ich auch allen übrigen Mitarbeitern der Lehrbereiche Mikrobiologie I und II, welche meine Arbeit hilfreich unterstützten.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1.	Chemikalien	3
2.2.	Teststämme	4
2.3.	Nährmedien	8
2.4.	Stammhaltung	13
2.5.	Fermentation	14
2.5.1.	Schüttelkulturen	14
2.5.2.	Fermentation im 10 l Maßstab	14
2.5.3.	Fermentation im 25 l Maßstab	14
2.5.4.	Fermentation im 200 l Maßstab	15
2.5.5.	Fermentationsanalyse	15
2.5.5.1.	Bestimmung des Antibiotikagehaltes	15
2.5.5.2.	pO_2-Messung	16
2.5.5.3.	Messung der Wasserstoffionenkonzentration	16
2.5.5.4.	Bestimmung des Zellvolumens	16
2.5.5.5.	Mannitbestimmung	16
2.6.	Ermittlung des Temperaturoptimums	17
2.7.	Isolierung von Rhizocticin und einer weiteren antifungischen Komponente	18
2.7.1.	Isolierung aus T-Medium	18
2.7.2.	Isolierung aus definierten Produktionsmedien	20
2.8.	Hochspannungselektrophorese	21
2.9.	Dünnschichtchromatographie	21
2.10.	Bestimmung der pH- und Temperaturstabilität	22

2.11.	Test auf Inaktivierung von Rhizocticin durch Oxidationsmittel	22
2.12.	Plattendiffusionstests	23
2.12.1.	Herstellung von Testplatten mit Sproßpilzen und Bakterien	23
2.12.2.	Herstellung von Testplatten mit sporenbildenden Pilzen und Streptomyceten	23
2.12.3.	Testverfahren mit Pilzkolonien auf Agarplatten	24
2.12.4.	Kreuztest	24
2.12.5.	Bioautographie	25
2.13.	Verdünnungsreihentests	25
2.13.1.	Verdünnungsreihentest mit Malzagar	25
2.13.2.	Verdünnungsreihentest mit flüssigem Malzmedium	26
2.14.	Test auf Aktivität gegen Protozoen	26
2.15.	Test auf Aktivität gegen Nematoden	27
2.16.	Phytotoxizitätstest	28
2.17.	In vitro-Mitogenitätstest	28
2.18.	Biophotometerversuche	29
2.19.	Einbauversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen der Protein- und RNA-Biosynthese	30
3.	ERGEBNISSE	32
3.1.	Optimierung der Nährlösung	32
3.1.1.	Supplementation mit verschiedenen Stickstoffquellen	32
3.1.2.	Variation der Kohlenstoffquelle	33
3.2.	Temperaturoptimum	38

3.3.	Fermentation im Labor- und technischem Maßstab	38
3.4.	Chemisch-physikalische Charakterisierung von Rhizocticin	43
3.4.1.	Dünnschichtchromatographische Charakteristika	43
3.4.2.	Nachweis von Rhizocticin mit verschiedenen Sprühreagenzien	43
3.4.3.	Verhalten in der Hochspannungselektrophorese	44
3.4.4.	pH- und Temperaturstabilität	44
3.4.5.	Stabilität von Rhizocticin gegen Oxidationsmittel	45
3.4.6.	Löslichkeitsverhalten	45
3.4.7.	Aminosäurenanalyse	45
3.4.8.	Chemische Untersuchungen zu Rhizocticin I	46
3.4.8.1.	Massenspektren von Rhizocticin I	47
3.4.8.2.	NMR-Spektren von Rhizocticin I	47
3.4.8.3.	Zusammenfassung der chemischen Untersuchungen zu Rhizocticin I	47
3.4.9.	Chemische Untersuchungen zu Rhizocticin II	50
3.5.	Biologische Charakterisierung des Rhizocticins	51
3.5.1.	Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Rhizocticin-Konzentration	51
3.5.2.	Wirkung gegen Pilze und Bakterien	52
3.5.3.	Wirkung gegen Protozoen	59
3.5.4.	Wirkung gegen Nematoden	59
3.5.5.	Phytotoxizität	59
3.5.6.	Mitogene Wirkung und Toxizität gegen Mäuselymphocyten	59

3.5.7. Inaktivierende Wirkung von Pilzkolonien auf Rhizocticin 61
3.5.8. Abhängigkeit der antibiotischen Wirkung vom Zeitpunkt der Antibiotikumszugabe 61
3.5.9. Fungizide Wirkung 62
3.5.10. Aufhebung der Hemmung durch Aminosäuren 65
3.5.11. Kompetition durch Peptide 68
3.5.12. Aufnahme von Rhizocticin in die Zelle und Beeinflußung des Transports durch L- und D-Cystin 68
3.5.13. Untersuchungen Borrelidin-resistenter Hefemutanten auf Kreuzresistenz mit Rhizocticin 72
3.5.14. Untersuchungen mit einer Threonin-auxotrophen *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante 74
3.5.15. Wirkung von Rhizocticin auf die RNA- und Proteinbiosynthese 74

4. DISKUSSION 76

4.1. Medienoptimierung, Fermentation und Aufarbeitung 76
4.2. Vergleich von Rhizocticin mit anderen Peptidantibiotika aus Mikroorganismen 78
4.3. Überlegungen zum Wirkspektrum 79
4.4. Wirkungsweise 82

5. ZUSAMMENFASSUNG 91

6. LITERATUR 93

7. ANHANG 110

7.1. Chemische Struktur von Rhizocticin I 110

7.2. Chemische Struktur von Rhizocticin II 114

7.3 Chemische Struktur von Rhizocticin III 117

Falls nicht anderweitig aufgeführt, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Abkürzungen verwendet:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
CBS	Central Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
cpm	counts per minute
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen, Göttingen, Bundesrepublik Deutschland
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ETH	Stammsammlung des Instituts für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz
IFO	Institut for Fermentation, Osaka, Japan
NRRL	Northern Utilization Research and Development Division U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois
PCI	Penicillin Control and Immunology Section, Food and Drug Administration, 7 th and Jefferson Drive S.W. Washington, D.C. 20204, USA
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
ppm	parts per million
R_f	ratio of frontiers
rpm	revolutions per minute
Tü	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen
U	units

Für Aminosäuren, Peptide, Purin- und Pyrimidinbasen sowie für Nucleinsäuren wurden die geläufigen Standardabkürzungen verwendet.

1. Einleitung

Michener und Snell (1949) entdeckten in Kulturen des als Produzenten des antibakteriellen Antibiotikums Subtilin bekannten *Bacillus subtilis*-Stammes ATCC 6633 zwei antifungische Komponenten, welche sie nach der Empfindlichkeit ihrer Testorganismen als Rhizoctonia-Faktor und als Aspergillus-Faktor bezeichneten. Der Rhizoctonia-Faktor wurde als hydrophile, niedermolekulare Substanz mit schwacher Wirkung gegen Hefen charakterisiert; beim Aspergillus-Faktor handelt es sich hingegen um eine mäßig lipophile Komponente mit ausgeprägter Aktivität gegen Hefen.

Über die stoffliche Natur und die Wirkungsweise des Rhizoctonia-Faktors war bisher nichts bekannt. Das verwundert um so mehr, als *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ein weltweit benutzter Teststamm ist, mit dem beispielsweise Streptomycin-Hemmungen festgestellt und quantifiziert werden.

Im Verlauf eigener Recherchen (Kugler, 1984) zeigte sich, daß der *Bacillus subtilis*-Stamm PCI 219 mit ATCC 6633 identisch ist. Ebata und Mitarbeiter (1969) isolierten aus PCI 219 drei antifungische Metabolite der Bacillomycin-Gruppe, welche sie als Subsporine bezeichneten. Diese Antibiotika entsprechen dem Aspergillus-Faktor in wesentlichen biologischen und physikalischen Eigenschaften, so daß an der Identität nicht zu zweifeln ist.

Ebata und Mitarbeiter (1969) hatten den Rhizoctonia-Faktor und das zeitlich vorher erscheinende Bacilysin, ein gleich dem Rhizoctonia-Faktor niedermolekulares, hydrophiles Antibiotikum, übersehen.

Bacilysin, das Dipeptid Alanyl-(2,3-Epoxycyclohexanono-4-)alanin

(Walker & Abraham, 1970), wurde erstmals 1946 (Forster & Woodruff) ohne Angaben zur chemischen Struktur unter dem Namen Bacillin, 1949 als Bacilysin (Newton) und 1973 nochmals als Tetain (Chmara & Borowski) beschrieben. In zwei Fällen waren die Produzenten Stämme der Art *Bacillus subtilis* und einmal *Bacillus pumilus*. Früher galten Bacilysin-produzierende Stämme als selten und die Produktionsbedingungen als schwierig (Borowski et al., 1965). Nach neueren Beobachtungen (Kugler, 1984; Loeffler et al., 1986) wurde Bacilysin auch von *Bacillus subtilis* F-29-3, dem Fengymycin-Produzenten (Vanittanakom, 1985; Vanittanakom et al., 1986), sowie von allen übrigen untersuchten Wildstämmen der Species *Bacillus subtilis* sowie von je einem Stamm der Arten *Bacillus pumilus* und *Bacillus licheniformis* in verschiedenen Medien gebildet. Die Substanz hemmt einige Bakterien, die Sproßpilze *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*, ist aber im Gegensatz zum Rhizoctonia-Faktor gegen Hyphenpilze praktisch wirkungslos.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hauptkomponente des Rhizoctonia-Faktors, von unserer Arbeitsgruppe Rhizocticin genannt, hergestellt, isoliert und als Reinsubstanz für chemische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Außerdem sollten das Wirkspektrum ermittelt und Untersuchungen zur Wirkungsweise ausgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet.

BP Chemicals, Düsseldorf	Polyol PPG 2025
Ciba-Geigy, Basel, Schweiz	Ferrioxamin B
Difco Laboratories, Detroit	Bacto Agar Bacto Malt Extract Yeast Nitrogen Base
Fiedler, Dr. P., Lehrbereich Mikro. I, Universität Tübingen	Nikkomycin Z
Heyden, München	Amphotericin B
Oxoid Ltd., London	Hefeextrakt Fleischextrakt (Lab Lemco Powder)
Pharmacia, Uppsala, Schweden	Sephadex G-15 Sephadex CM-25

Radiochemical Center, Amersham, Buckinghamshire, England	^{14}C-Phenylalanin, ^{3}H-Thymin, ^{14}C-Uracil
Röhl, Dr. F., Lehrbereich Mikro. I, Universität Tübingen	Valclavam
Schoenenberger, Stuttgart	Sojamehl
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	Amberlite XAD- 16 Di-, Tri und Oligo-peptide
Sigma Chemical Company, St. Louis, USA	Cycloheximid
Siegfried, Zofingen, Schweiz	Oxiconazol
Vanittanakom, Dr. N., Lehrbereich Mikro. I, Universität Tübingen	Bacilysin

2.2. Teststämme

a) Bakterien

Achromobacter geminiani Ravenel, Mikrobiologie Göttingen
Arthrobacter aurescens (Clark) Philips ATCC 13344
Arthrobacter oxidans Sguros ATCC 14358
Bacillus cereus Frankland & Frankland ATCC 6464

Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn ATCC 6051

Brevibacterium flavum Okumura et al. ATCC 14067

Clostridium pasteurianum Winogradsky ATCC 6013

Corynebacterium insidiosum (Mc Culloch) Jensen ATCC 10253

Escherichia coli (Migula) Castellani & Chalmers K 12

Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn ATCC 381

Proteus mirabilis Hauser ATCC 29906

Proteus vulgaris Hauser ATCC 13315

Pseudomonas fluorescens Migula ATCC 13525

Salmonella typhimurium (Loeffler) Castellani & Chalmers
LT 2, DSM 554

Staphylococcus aureus Rosenbach ETH 2070, =Tü 202

Streptomyces glaucescens (Preobrazhenskaya) Pridham et al. Tü 49

Streptomyces violaceoruber (Waksman & Curtis) Pridham Tü 22

Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman & Henrici Tü 57

b) Pilze	Temp. (°C)
Alternaria kikuchiana Tanaka Tü 169	27
Ascobolus carbonarius Karsten (Isolat von Herrn cand.rer.nat. P. Zinth)	RT
Ascodesmis sphaerospora Obrist Tü 147	27
Aspergillus fumigatus Fresenius ETH 4929, =Tü 161	27
Aspergillus terreus Thom Tü 155	27
Basidiobolus microsporus R.K. Benjamin CBS 130.62, Tü 174	27
Candida albicans (Robin) Berkhout ATCC 18804, =CBS 562, IFO 1385, Tü 565	27

	Temp. (°C)
Candida guilliermondii (Castellani) Langeron & Guerra var. *japonica* Sugiyama & Goto ATCC 22017, =CBS 6021, =Tü 8053	27
Cladosporium carrionii Trejos CBS 160.54 (Nr. 1)	27
Cladosporium trichoides Emmons Nr. 3, 4	27
Curvularia lunata (Wakker) Boedijn Tü 627	27
Dipodascus magnusii (Ludwig) von Arx CBS 151.30, =Tü 167	27
Entomophthora coronata (Costantin) Kevokian CBS 176.55, =Tü 256	27
Epidermomyces floccosus (Harz) Loeffler CBS 240.67, =Tü 576	27
Exophiala mansonii (Castellani) de Hoog CBS 101.67, (Nr.10); CBS 358.29 (Nr.6); Tü 275 (Nr.5)	27
Exophiala werneckii (Horta) von Arx (Nr.13)	27
Fusarium sp. Tü 8014	27
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart & Grigorakis ATCC 42899, =Tü 282	27
Mycotypha africana Novak & Backus Tü 260	27
Nematospora coryli Peglion ATCC 10647, =Tü 194	27
Paecilomyces variotii Bainier Tü 137	37
Penicillium notatum Westling Tü 136	27
Plicaria anthracina (Cooke) Boudier (Isolat von Herrn cand.rer.nat. P. Zinth)	RT
Rhinocladiella compacta (Carrion) Schol-Schwarz Nr.16	27
Rhinocladiella pedrosoi (Brumpt) Schol-Schwarz Nr.19	27
Rhizoctonia solani Kuehn Tü 535	27
Rhizomucor miehei (Cooney et Emerson) Schipper Tü 284	37

	Temp. (°C)
Rhodotorula rubra (Demme) Lodder Tü 8093	27
Saccharomyces cerevisiae Hansen Tü 125;	27
ATCC 42800, =Σ1278b.gpp$^-$;	
ATCC 21830 (his$^-$, leu$^-$, thr$^-$);	
D-286-2A (ade$^-$, his$^-$); BOR 1-X (ade$^-$, his$^-$);	
BOR2-XI (ade$^-$, his$^-$); BOR3-XIII (ade$^-$, his$^-$);	
BOR-I (ade$^-$, his$^-$); α-S288-C; BOR1; BOR2	
Saccharomycopsis lipolytica (Wickerham et al.)	27
Yarrow ATCC 8097, =NRRL 1094, =Tü 8097	
Schizosaccharomyces pombe Lindner Tü 251	27
Sordaria macrospora Auerswald Tü 128	27
Stemphylium sarciniforme (Cavara) Wiltshire DSM 63045	27
Stemphylium sp. Tü 609	27
Trichophyton erinacei (Smith & Marples) Padhye &	27
Carmichael Tü 8101	
Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard Tü 510	27
Trichophyton rubrum (Castellani) Sabouraud Tü 299	27
Ustilago maydis (De Candolle) Corda ATCC 14826,	27
=CBS 445.63, =Tü 567	

Einen Teil der zur Ermittlung des Wirkspektrums benützten Pilzstämme verdanke ich Frau Prof. Dr. Luise Krempl Lamprecht, Dermatologische Klinik der TU München. Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Poralla, Lehrbereich Mikrobiologie I, Universität Tübingen, für die Überlassung der Borrelidin-resistenten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme (BOR-Mutanten) danken.

2.3. Nährmedien

Die Medien wurden bei 121°C 20 Minuten lang autoklaviert. Die pH-Werte wurden vor dem Autoklavieren eingestellt. Für feste Nährböden wurden 2 % Agar hinzugegeben. Die Gewichtsangaben beziehen sich jeweils auf 1 l Wasser. Falls nicht anders angegeben, wurden für komplexe Medien Leitungswasser und bei definierten Medien entionisiertes Wasser verwendet. Glucose und Vitamine für Minimalmedien wurden getrennt autoklaviert. Auxotrophe *Saccharomyces cerevisiae*-Mutanten wurden mit jeweils 30 mg/l der benötigten Verbindungen supplementiert.

a) Medien für Stammhaltung, Testplatten und Untersuchungen zur Wirkungsweise

Hefeagar, HA

Hefeextrakt	4,0	g
Malzextrakt	10,0	g
Glucose	4,0	g
entionisiertes Wasser	1,0	l
pH gemessen	5,5	

Hefeagar, neutralisiert, nHA

Zusätze vgl. HA, jedoch		
pH	7,3	

Nähragar, Komplettmedium für Bakterien, NA

Ox Lab Lemco Fleischextrakt	3,0	g
Pepton aus Casein	5,0	g
NaCl	2,5	g
pH	7,3	

Komplettmedium für Bakterien, Ox

Ox Lab Lemco Fleischextrakt	10,0	g
Pepton aus Casein	10,0	g
NaCl	5,0	g
pH	7,2	

Nutrient Broth-Medium, NB

Nutrient Broth	8,0	g
pH	7,0	

Medium für Clostridien, Clost

Pepton aus Casein	20,0	g
Glucose	5,0	g
Malzextrakt	3,0	g
Ox Lab Lemco Fleischextrakt	3,0	g
Hefeextrakt	3,0	g
Ascorbinsäure	200,0	mg
pH	7,0	

Minimalmedium für Bakterien, MB

Glucose	8,0	g
NaCl	5,0	g
Di-Ammoniumtartrat	4,0	g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1,0	g
K_2HPO_4	2,0	g
$CaCl_2$	200,0	mg
$MnSO_4 \times H_2O$	10,0	mg
Ferrioxamin B	20,0	mg
pH	7,0	

Malzmedium, MA

Malzextrakt	20,0	g
entionisiertes Wasser	1,0	l
pH gemessen	6,0	

Czapek-Dox Medium, CD (Raper & Fennell, 1965)

Saccharose	30,0	g
NH_4NO_3	3,0	g
K_2HPO_4	1,0	g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	500,0	mg
KCl	500,0	mg
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	10,0	mg

Yeast Nitrogen Base Medium, YNB

Yeast Nitrogen Base	1,7	g
$(NH_4)_2SO_4$	5,0	g
Glucose	20,0	g

Edinburgh Minimal Medium No 2 (Mitchison, 1970), EMM 2

Glucose	10,0	g
NH_4Cl	5,0	g
NaH_2PO_4	300,0	mg
Natriumacetat	1,0	g
KCl	1,0	g
$MgCl_2$	500,0	mg
Na_2SO_4	10,0	mg
$CaCl_2$	10,0	mg
meso-Inosit	10,0	mg
Nicotinsäure	10,0	mg
Calcium-D(+)-pantothenat	1,0	mg
D(+)-Biotin	10,0	µg

b) Produktionsmedien

Tschen-Medium, T

Glucose	15,0	g
Glycerin	10,0	g
Sojamehl	15,0	g
$(NH_4)_2SO_4$	5,0	g
Hefeextrakt	1,0	g
NaCl	5,0	g
$CaCO_3$	5,0	g
entionisiertes Wasser	1	l
pH	7,3	

Definiertes Medium nach Landy, L

Glucose	20,0	g
Glutaminsäure	5,0	g
KH_2PO_4	1,0	g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	500,0	mg
KCl	500,0	mg
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,15	mg
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,16	mg
$MnSO_4$	5,0	mg
pH	6,0	

Definiertes Produktionsmedium auf der Basis von Landy-Medium,PL

wie L-Medium, an Stelle von Glucose jedoch 20 g Mannit und zusätzlich 1 g Asparagin.

2.4. Stammhaltung

Der Rhizocticin-Produzent *Bacillus subtilis* ATCC 6633 wurde bei Bedarf, spätestens alle sechs Monate, auf Schrägagarröhrchen mit nHA- beziehungsweise NA-Agar überimpft, bei 37°C zehn Tage lang inkubiert und bei 18°C vorrätig gehalten.

2.5. Fermentation

2.5.1. Schüttelkulturen

500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich (Schikane), die 100 ml Nährlösung enthielten, wurden mit 0,4 ml Sporensuspension beimpft und bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine (Typ RO 106, Infors AG, Basel, Schweiz) bei 120 rpm und einem Auslenkradius von 25 mm inkubiert. Zur Herstellung der Sporensuspension wurden versporte Kulturen aus Schrägagarröhrchen im Alter von mehr als 10 Tagen mit 8 ml deionisiertem Wasser abgeschwemmt. Geerntet wurde nach 72 Stunden.

2.5.2. Fermentation im 10 l Masstab

Fermenter mit 10 l Nutzinhalt (Modell FS-314, New Brunswick Scientific Co.) wurden mit 7 l Nährlösung gefüllt und 30 Minuten bei 134°C sterilisiert. Der abgekühlte Fermenter wurde mit 1 l einer 10 Tage alten Vorkultur angeimpft. Die Rührgeschwindigkeit betrug 220 rpm. Belüftet wurde mit 3, 5 und 7 l steriler Luft/Minute. Während des Fermentationsverlaufes wurden bis zu 20 ml Polyol hinzugegeben.

2.5.3. Fermentation im 25 l Masstab

Bei 25 l-Fermentern mit Umwurfsystem (Typ b 25, Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz) wurden 19 l des definierten Produktionsmediums nach der in situ erfolgten Sterilisation (121°C, 30 min)

mit 5 % einer mindestens 10 Tage alten, gut sporulierenden Kultur beimpft. Vorkulturen für Fermentationen im 25 l und 200 l Maßstab wurden vor Verwendung als Impfmaterial erhitzt (60°C, 1 h). Die Inkubationstemperatur betrug 27°C, die Rührgeschwindigkeit 800 rpm und die Belüftung 5 l Luft/min. Die Schaumbildung konnte während des Fermentationsverlaufes durch wiederholte Polyolzugaben weitgehend unterdrückt werden.

2.5.4. Fermentation im 200 l Masstab

Der 200 l-Fermenter (Typ b 200 Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz) verfügt wie der 25 l-Fermenter über ein Intensor-Umwurfsystem zur Belüftung der Kulturbrühe. Die Sterilisation mit 200 l definiertem Produktionsmedium wurde wie beim 25 l-Fermenter durchgeführt. Als Impfmaterial dienten 5 l einer sporulierenden Schüttelkultur mit einem Mindestalter von 10 Tagen. Die Fermentationsparameter waren 27°C, 800 rpm und 50 l Luft/min.

2.5.5. Fermenationsanalyse

2.5.5.1. Bestimmung des Antibiotikagehaltes

1 ml Kulturbrühe wurde in einer Eppendorftisch-Zentrifuge 10 Minuten lang zentrifugiert und der Antibiotikagehalt des klaren Überstandes mit Hilfe des Agardiffusionstests nach 2.12. bestimmt.

2.5.5.2. pO_2-Messung

Im 25 l-Fermenter wurde der Sauerstoffpartialdruck in der Kultur kontinuierlich mit einer in situ sterilisierbaren Sauerstoffelektrode der Fa. Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz, Modell IL 531, gemessen und kontinuierlich aufgezeichnet. Das konstante Meßsignal der Sauerstoffelektrode vor dem Animpfen wurde als Sättigungskonzentration (pO_2 = 100 %) angenommen.

2.5.5.3. Messung der Wasserstoffionenkonzentration

Der pH-Wert wurde mittels eines laborüblichen pH-Meters (Typ pH-mV-Meter) bestimmt und im Falle des 25 l-Fermenters zusätzlich kontinuierlich über eine sterilisierbare pH-Elektrode (Typ 465-VT) der Fa. Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz, gemessen.

2.5.5.4. Bestimmung des Zellvolumens

10 ml Kulturbrühe wurden in graduierten Gläsern 10 Minuten lang bei 3000 rpm zentrifugiert und die Sedimentmenge in Prozent angegeben.

2.5.5.5. Mannitbestimmung

a) Probenaufbereitung

Die Bestimmung der Mannitkonzentration wurde nach Reuschenbach (1986) durchgeführt. Kulturbrühe wurde wie unter 2.5.5.1. darge-

stellt zentrifugiert und 20 µl des klaren Überstandes auf nachstehend beschriebene Säule aufgespritzt.

b) Apparatur

Pumpe:	HPLC-Pumpe, Typ FR-30, Knaur, Berlin
Detektor:	Melz-Differential-Refraktometer, Typ LCD 201, Bischoff, Leonberg
Integrator:	Hewlett Packard, Modell 3080 A, Paolo Alto, USA
Säule:	Analytische Säule: Nucleosil-NH_2, Korngröße 5 µm, 125 mm Länge (L.) x 4,6 mm Innendurchmesser (I.D.), Bischoff, Leonberg
Vorsäule:	Nucleosil-NH_2, Korngröße 5 µm, 20 mm L. x 4,6 mm I.D., Bischoff, Leonberg
Fließmittel:	Acetonitril/Aqua bidest. (80/20)
Fließgeschwindigkeit:	1,5 ml/min

Zur Eichung der Apparatur wurden unterschiedlich konzentrierte Mannitlösungen (0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,0 %) eingespritzt.

2.6. Ermittlung des Temperaturoptimums

Zur Bestimmung der optimalen Produktionstemperatur wurde ein Temperature Gradient Incubator (Modell TN 3, Fa. Toyo Kagaku Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) verwendet. Rechtwinklig gebogene Reagenzgläser, gefüllt mit 10 ml definiertem Produktionsmedium,

wurden in Intervallen von ca. 1°C über einen Gradienten von 17°C bis 42°C verteilt, mit 0,4 ml einer Sporenlösung beimpft und drei Tage unter gleichmäßigem Schütteln (Stufe 2) inkubiert. Alle 24 Stunden wurde aus jedem Röhrchen Probe entnommen und im Plattendiffusionstest die biologische Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 und *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 ermittelt.

2.7. Isolierung von Rhizocticin und einer weiteren antifungischen Komponente

2.7.1. Isolierung aus T-Medium

Schritt 1: 5 l Kulturbrühe wurden mit 5 N HCl auf pH 2,5 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde in einer Sorvall-Zentrifuge mit einem GSG 3 Rotor bei 10 000g (ca. 8 000 rpm) abgetrennt und verworfen. In der Folge wurde der Überstand bei 50°C zur Trockene eingeengt und in 500 ml 70 % Ethanol aufgenommen.

Schritt 2: Bei 4°C wurde eine erneute Fällung durchgeführt und das Präzipitat vom hochaktivem Überstand getrennt. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 200 ml 70 % Ethanol extrahiert, die aktiven Überstände vereinigt und eingeengt.

Schritt 3: Anschließend wurde das bräunliche Konzentrat in 500 ml deionisiertem Wasser aufgenommen, auf pH 3 eingestellt und im Batch-Verfahren mit 150 g Amberlite XAD-16 eine Stunde lang gerührt. Hierdurch konnten melaninartige und lipophile Verunrei-

nigungen an das Adsorberharz gebunden werden, während Rhizocticin und eine weitere gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 aktive Komponente nicht adsorbiert wurden. Das Adsorberharz wurde abgetrennt, mit 200 ml deionisiertem Wasser gewaschen und die wässrigen Fraktionen vereinigt. Der Reinigungsvorgang mit Amberlite XAD 16 wurde wiederholt und das gesamte wässrige Volumen wieder eingeengt.

Schritt 4: Das konzentrierte, nun gelbe Präparat wurde erneut in 70 % Ethanol gelöst und wiederum eine Präzipitation bei 4°C durchgeführt. Die Fällung wurde stufenweise mit Ethanolkonzentrationen von 80 und 90 % sowie mit 1 l Diethylether wiederholt. Die aktivsten Präzipitate wurden vereinigt und lyophilisiert.

Schritt 5: Das Lyophilisat wurde in 10 - 15 ml 5 % Ethanol aufgenommen und durch eine Gelfiltration an Sephadex G-15 (l: 90 cm; d: 6 cm; v: 30 ml/h) mit 5 % Ethanol als Fließmittel weiter gereinigt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und in 2 ml 5 % Ethanol aufgenommen. Nachfolgend wurde ein erneuter Chromatographiedurchgang mit einer zweiten G-15-Säule (l: 90 cm; d: 2,5 cm; v: 30 ml/h) angeschlossen.

Schritt 6: Die lyophilisierten, aktiven Fraktionen des vorhergehenden Schrittes wurden in 2 ml 5 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 4 gelöst und auf eine Sephadex CM-25-Säule (l: 90 cm; d: 2,5 cm; v: 30 ml/h) aufgetragen. Während die meisten Verunreinigungen bei oben genanntem Puffer als Fließmittel nicht an den schwachen Ionenaustauscher gebunden wurden, wurden Rhizocticin und eine wei-

tere Komponente mit Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 adsorbiert. Beide antifungischen Komponenten konnten mit 100 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 4 nacheinander eluiert werden. Die aktiven Fraktionen von Rhizocticin und der zweiten gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 aktiven Komponente wurden getrennt vereinigt und eingeengt.

Schritt 7: Zur Endreinigung von Rhizocticin und der zweiten antifungisch aktiven Komponente wurde jeweils die Ausschlußchromatographie mit Sephadex G-15 bei reduzierter Geschwindigkeit (l: 90 cm; d: 2,5 cm; v: 15 ml/h; Fließmittel: 5 % Ethanol) wiederholt.

2.7.2. Isolierung aus definierten Produktionsmedien

Rhizocticin aus Schüttelkulturen in definierten Medien wurde unter Weglassung von Schritt 4 nach dem unter 2.7.1. beschriebenen Aufarbeitungsschema isoliert.

Bei der Aufarbeitung von 25 bzw. 200 l-Fermentern wurde die Zellmasse zwischen pH 2,5 und 3 mit einer Schlammzentrifuge abgetrennt. Ein sofortiges Einengen am Dünnschichtverdampfer war wegen stark schäumender Fermentationsprodukte nicht durchführbar. Durch Säulenchromatographie an Amberlite XAD-16 (1/10 des Ausgangsvolumens) konnten die störenden Detergentien sowie ein Teil der lipophilen und melaninartigen Verunreinigungen gebunden werden. Der wäßrige Durchlauf und das Waschwasser (doppeltes Säulenvolumen) wurden bei 60°C am Dünnschichtverdampfer eingeengt und lyophilisiert.

2.8. Hochspannungselektrophorese

Auf einem Gerät der Firma Serva Gmbh & Co, Heidelberg, wurde mit nachstehend aufgeführten Puffern und pH-Werten die Hochspannungselektrophorese durchgeführt:

-Glycin/HCl-Puffer pH 3

-Phosphat-Puffer pH 7

-Glycin/NaOH-Puffer pH 10, 11.

Auf puffergetränkte Filterpapierstreifen (Elektrophoresepapier MN 261, Macherey & Nagel, Düren) von 5 cm Breite wurden in der Mitte 30 µl um den Faktor 10 angereichertes Kulturfiltrat in 70 %-iger Ethanollösung aufgetragen. Die Spannung betrug 3000 V während einer Versuchsdauer von 20 Minuten. Nach Ende des Elektrophoreselaufes wurden die Papierstreifen in passende Stücke zerschnitten und mit Hilfe des Agardiffusionstests die Lage der antifungischen Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 untersucht.

2.9. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (Stahl, 1967) wurden DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Es wurden ausschließlich Trennkammern mit aufsteigenden Fließmittelsystemen verwendet. Als bestes Fließmittel erwies sich das Gemisch Chloroform/Methanol/15 % Ammoniak (2/2/1). Im Ergebnisteil sind unter 3.4.2. weitere Fließmittel und die dazugehörenden R_f-Werte angegeben.

Im Anschluß an die Chromatographie erfolgte die Detektion des Antibiotikums bzw. der Verunreinigungen durch Bioautographie sowie

durch Anfärben mit 4,4- Tetramethyldiaminodiphenylmethan (TDM) und Ninhydrin (vgl. hierzu 2.12.5. und 3.4.2.).

2.10. Bestimmung der pH- und Temperaturstabilität

Für die Untersuchungen zur pH- und Temperaturstabilität wurde Natriumcitrat/HCl-Puffer (0,1 M) bei pH 2,5, Tris/HCl-Puffer (0,2 M) bei pH 7,2 und Tris/NaOH-Puffer (0,04 M) bei pH 9 verwendet. Eine Rhizocticin-Stammlösung (1,75 mg/ml) wurde mit den einzelnen Puffern 1:10 verdünnt. Die Änderung der biologischen Aktivität bei 95°C und verschiedenen pH-Werten wurde über sechs Stunden verfolgt. Hierzu wurden jeweils Proben von 10 µl entnommen und auf Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 getestet.

2.11. Test auf Inaktivierung von Rhizocticin durch Oxidationsmittel

Zu 40 µl einer 10 %-igen Perhydrollösung wurden 10 µl einer Rhizocticin-Stammlösung (1,75 mg/ml) gegeben. Innerhalb einer Zeitspanne von zwei Stunden wurden fünf 10 µl Proben nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten entnommen, auf Filterpapierrondellen pipettiert und zwei Stunden lang getrocknet. Der biologische Test erfolgte mit *Paecilomyces variotii* Tü 137. Parallel hierzu wurden Proben einer 8 %-igen Perhydrollösung (Kontrolle) und einer 7 %-igen ethanolischen Lösung des Antibiotikums (0,35 mg/ml) behandelt und ebenfalls auf ihre biologische Aktivität getestet.

2.12. Plattendiffusionstests

Der Plattendiffusionstest wurde nach Zähner & Maas (1972) mit sterilen Petrischalen aus Polystyrol (85 mm Durchmesser, Fa. Greiner, Nürtingen) durchgeführt. Sofern er nicht als Kreuztest (2.12.4.) oder als Bioautographie (2.12.5) auszuführen war, wurden Filterpapierrondellen (6 mm; Macherey, Nagel & Co., Düren) mit 10 µl Testlösung getränkt, getrocknet und aufgelegt. Als Testorganismus für die Detektion des Rhizocticins und weiterer antifungischer Komponenten des Rhizoctonia-Faktors wurde *Paecilomyces variotii* Tü 137, für den Bacilysin-Nachweis *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 verwendet. Da Subsporine im Kulturfiltrat nicht nachzuweisen waren, konnten sowohl Bacilysin als auch die Komponenten des Rhizoctonia-Faktors ohne Schwierigkeiten im Agardiffusionstest detektiert werden.

2.12.1. Herstellung von Testplatten mit Sprosspilzen und Bakterien

Die Testkeime wurden über Nacht (ca. 16 Stunden) in 20 ml-Schüttelkulturen angezogen. Von diesen Vorkulturen wurden 2 ml in 200 ml 45°C warmen Agar gegeben und je 10 ml keimhaltiger Agar in sterile Petrischalen gegossen.

2.12.2. Herstellung von Testplatten mit sporenbildenden Pilzen und Streptomyceten

Von auf Schrägagarröhrchen mit Hefeagar bis zur Sporulation gezo-

genen Testkeimen wurden die Sporen mit 5 ml steriler, wässriger Natriumlaurylsulfat-Lösung (100 mg/ml) abgeschwemmt, 2 ml für 200 ml Agar verwendet und die Testplatten damit gemäß 2.12.1. gegossen.

2.12.3. Testverfahren mit Pilzkolonien auf Agarplatten

Die von Hütter und Mitarbeitern (1965) sowie von Betina und Mitarbeitern (1966) beschriebenen Methoden wurden in veränderter Form zur Untersuchung der Wirkung von Rhizocticin auf wachsende Kolonien von *Ascobolus carbonarius*, *Plicaria anthracina* und *Rhizoctonia solani* herangezogen. Mit einem Korkbohrer (6 mm Durchmesser) wurden bewachsene Agarzylinderchen aus jungen Teilen der Pilzkolonien ausgestanzt und einzeln in die Mitte von Malzagarplatten gesetzt. Nach Inkubation bis zu einem Koloniedurchmesser von circa 20 - 30 mm wurden die Testrondellen in 3 mm Abstand zur Wachstumsfront aufgelegt. Die Platten wurden bei Raumtemperatur bzw. 27°C inkubiert und während zwei bis fünf Tagen auf Hemmzonen und morphologische Veränderungen untersucht.

2.12.4. Kreuztest

Untersuchungen zum Transport- und Wirkort-Antagonismus wurden mit Kreuztests nach Bonifas (1952) und Zähner & Maas (1972) durchgeführt.

Zur Vororientierung wurden sämtliche in Proteinen vorkommende Aminosäuren, verschiedene Nichtprotein-Aminosäuren wie (-)allo-Cystathionin, L-Cystathionin, D- und L-Cystin, Glutathion in re-

duzierter und oxidierter Form, L-Homocystein, L-Homocystin, L-Homoserin, D-Lanthionin, L-Ornithin, unterschiedliche Zucker, Vitamine, Purin- und Pyrimidinbasen sowie einige Di- und Oligopeptide getestet. In Fällen nachgewiesener antagonistischer Effekte wurden Untersuchungen mit verschiedenen Konzentrationen der aufhebenden Substanz und nachfolgende Versuche im Biophotometer (2.19.) zur eindeutigen Klärung herangezogen.

2.12.5. Bioautographie

Kieselgel-DC-Alufolien wurden nach der Entwicklung getrocknet, 3 mm breite Streifen ausgeschnitten, auf vorbereitete Testplatten gelegt und inkubiert. Der R_f-Wert des ermittelten Hemmstoffes ergab sich aus der Lage des Hemmhofmittelpunktes.

2.13. Verdünnungsreihentests

Die Bestimmmung der minimalen Hemmkonzentrationen des Rhizocticins für Sproß- und Fadenpilze wurden nach unterschiedlichen Methoden in Abwandlung des von Zähner und Maas (1972) beschriebenen Verfahrens durchgeführt.

2.13.1. Verdünnungsreihentest mit Malzagar

Das hier dargestellte Verfahren wurde bei einem Teil der Fadenpilze angewendet. Rhizocticin-Lösungen in 35 % Ethanol wurden in verschiedenen Konzentrationen hergestellt. 50 µl dieser Lösungen wurden zu 5 ml sterilem, 45°C warmem Malzagar hinzugegeben und in

sterile Petrischalen (55 mm Durchmesser) gegossen. Die Endkonzentrationen an Rhizocticin waren 3,5, 1,1, 0,35, 0,11, 0,035 und 0,011 µg/ml. Die Platten wurden mit zylindrischen Agarstückchen (6 mm Durchmesser) aus der Randzone wachsender Pilzkolonien zentral beimpft. Während eines Zeitraums von zwei bis zehn Tagen wurde der Durchmesser der wachsenden Kolonien gemessen. Die erhaltenen Meßdaten wurden zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) sowie der Konzentrationen, bei denen das Antibiotikum eine 50 %-ige (IC 50) bzw. eine 10 %-ige Wachstumshemmung (IC 10) verursacht, herangezogen. Kontrollplatten ohne Antibiotikum dienten als Referenz (100 % Wachstum).

2.13.2. Verdünnungsreihentest mit flüssigem Malzmedium

Die minimalen Hemmkonzentrationen von Rhizocticin für Sproßpilze (MIC) wurden in Mikrotiterplatten (24 Vertiefungen, 16 mm Durchmesser, Costar, Cambridge, USA) bestimmt. Diese enthielten pro Vertiefung 940 µl Malzmedium, 50 µl einer über Nacht in Malzmedium herangezogenen Vorkultur sowie 10 µl einer Rhizocticin-Lösung in 35 % Ethanol. Die Rhizocticin-Endkonzentrationen lagen im Bereich von 3,5 bis 0,011 µg/ml. Nach 24 Stunden Inkubationsdauer wurden diejenigen Konzentrationen in der Verdünnungsreihe als MIC bezeichnet, bei denen gerade kein Wachstum der Keime festgestellt werden konnte.

2.14. Test auf Aktivität gegen Protozoen

Der Ciliat *Paramecium caudatum* wurde in einer Heuaufgußkultur an-

gezogen und in Portionen von 180 µl auf die einzelnen Vertiefungen von Mikrotiterplatten (wie 2.13.2) verteilt. Anschließend wurden pro Vertiefung 20 µl Rhizocticin-Lösung verschiedener Konzentrationen hinzupipettiert. Die Beweglichkeit der Protozoen in Ansätzen mit und ohne Antibiotikum wurde über mehrere Tage lichtmikroskopisch verfolgt.

Für die Überlassung einer Kultur von *Paramecium caudatum* danke ich Herrn Prof. Dr. D. Ammermann.

2.15. Test auf Aktivität gegen Nematoden

Die Kultivierung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* N2 erfolgte nach der Beschreibung von Brenner (1974) in Petrischalen. Zur Fütterung der Nematoden wurde an Stelle von *Escherichia coli* Op 50 (Uracil$^-$) *Escherichia coli* 645 (Uracil$^-$; Stammsammlung des Institutes für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, Universität, Tübingen) verwendet. Eine 10 Tage alte Kultur von *Caenorhabditis elegans* N2 wurde mit Puffer (0,1 M NaCl und 0,005 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0) abgeschwemmt und in die einzelnen Vertiefungen von Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) je 100 µl der Wurmsuspension pipettiert. Der Titer der Nematoden betrug etwa 200 Würmer/ml. Die Rhizocticin-Endkonzentration wurde auf 35, 17,5, 7 und 3,5 µg/ml eingestellt. Inkubiert wurde bei 18°C. Alle 24 Stunden wurde die Vitalität der Würmer in den einzelnen Ansätzen mit verschiedenen Rhizocticin-Konzentrationen mikroskopisch mit der Kontrolle verglichen.

Für die Durchführung des Testes möchte ich mich bei Frau Dr. I. Frosch bedanken.

2.16. Phytotoxizitätstest

Die Wirkung von Rhizocticin auf Pflanzen wurde mit zwei Verfahren untersucht.

Methode 1: Im Test mit der Gartenkresse *Lepidium sativum* wurden jeweils 200 µl verschieden konzentrierter Rhizocticin-Lösungen auf Filterpapierscheiben (Durchmesser 50 mm) pipettiert und in kleinen Petrischalen (Durchmesser 55 mm) getrocknet. Anschließend wurden jeweils 50 Samen in gleichen Abständen auf die Filterpapierscheiben gelegt und mit 1 ml deionisiertem Wasser befeuchtet. Die Rhizocticin-Endkonzentrationen betrugen 70, 22 und 7 µg/ml. Nach Auswachsen der Wurzeln wurde die durchschnittliche Wurzellänge ermittelt und mit der Wurzellänge in verschiedenen Kontrollansätzen verglichen.

Methode 2: In Wasser ausgekeimte Bohnen (*Vicia faba*) wurden mit ihren Wurzeln in Röhrchen mit bis zu 14 µg/ml Rhizocticin (Gesamtvolumen jeweils 3,5 ml) gesetzt. Der Flüssigkeitsverlust in den Röhrchen während des Wachstums wurde durch Leitungswasser ausgeglichen. Das Wachstum von *Vicia faba* wurde über einen Zeitraum von drei Wochen untersucht.

2.17. In vitro-Mitogenitätstest

An einer Mäuselymphocyten-Kultur wurde Rhizocticin auf mitogene Wirkung (Cybulla et al., 1980; Bessler et al., 1982; Bessler et al., 1985) nach der Methode von Johnson und Mitarbeitern (1983) untersucht.

Die Lymphocyten wurden aus der Milz von 6 bis 14 Wochen alten

Balb/c-Mäusen (Ivanovas, Kissleg, BRD) gewonnen und in PRMI-Medium (Moore et al., 1967; Gibco Europe, Glasgow) unter Supplementierung von 3,3 % hitzeinaktiviertem foetalen Kälberserum (Seromed, München), 2 mM Glutamin, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und 2-Mercaptoethanol (5×10^{-5}M) aufgenommen. Je 133 µl Kultur (Zelltiter $3,3 \times 10^{6}$ Zellen/ml) wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden in den Vertiefungen von Falcon 3040-Mikrotiterplatten (Falcon Plastics, Oxnard, USA) bei 37°C inkubiert. Von den Testsubstanzen wurden jeweils 50 µl hinzugegeben. 24 Stunden vor der Ernte erfolgte die Zugabe von 25 µl ^{3}H-Thymidin (0,5 µCi) pro Vertiefung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Mash II-Erntegerät (Microbiological Associates, Walkersville, MD) geerntet, auf Glasfilter (Dynatech, Nürtingen, BRD) pipettiert und die Einbauraten (cpm) des radioaktiv markierten Thymidins in die DNA der Lymphocyten im Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer (1219 Rackbeta, LKB Wallar, Oy, Turku, Finland) bestimmt.

Frau M. Cox und Herrn Prof. Dr. W. Bessler danke ich für die Durchführung des Versuches.

2.18. Biophotometerversuche

Zur Aufnahme von Wachstumskurven und für Kompetitionsversuche wurde ein Biophotometer der Fa. Jouan, Paris, Frankreich, verwendet (Poralla, 1967). Die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte über Nacht (ca. 16 Stunden) in 20 ml Schüttelkulturen bei 27°C. 350 µl dieser Vorkultur wurden in 7 ml Malzmedium überimpft und der Schreiber des Gerätes auf eine Transmission von

90 % eingestellt. Rhizocticin und die Hemmung antagonisierende Substanzen wurden zu den in den einzelnen Versuchen angegebenen Zeitpunkten hinzupipettiert. Bei gleichbleibender Belüftung und Temperatur wurde über einen Zeitraum von mehreren Stunden kontinuierlich die Transmissionsveränderung als Maß für das Wachstum oder für fungizide bzw. fungistatische Effekte aufgezeichnet.

2.19. Einbauversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen der Protein- und RNA-Biosynthese

Die Einbauversuche wurden mit *Saccharomyces cerevisiae* als Testorganismus bei 27°C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Eine logarithmisch in Malzmedium wachsende Kultur wurde durch die Zugabe von 1 µg/ml nicht radioaktiv markiertem Phenylalanin und Uracil 10 Minuten vor Einbaubeginn adaptiert. In Gläschen mit und ohne Antibiotikum wurden jeweils entweder 0,25 µCi Phenylalanin oder 0,25 µCi Uracil pipettiert. Der Einbau wurde durch Zugabe von je 800 µl der vorbehandelten Kultur gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils 200 µl Probe entnommen und zur Fällung zu 500 µl 10 %-iger Trichloressigsäure pipettiert. Die so behandelten Proben wurden über Membranfilter (25 mm Durchmesser, 0,45 nm Porengröße, Sartorius-Membranfilter-Gmbh, Göttingen) abgesaugt, dreimal mit 5 %-iger Trichloressigsäure gewaschen und unter einer Infrarotlampe getrocknet. Die Filter wurden in Plastikgläschen gegeben, mit je 2 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt und im Szintillationsspektrometer (1219 Rackbeta, LKB Wallar, Oy, Turku, Finland) die in die Makromoleküle eingebaute Radioaktivität als cpm gemessen.

Der Einbau von radioaktivem Thymin in die Hefe-DNS wurde nicht untersucht, da *Saccharomyces cerevisiae* keine Thymidinkinase besitzt (Grivell et Jackson, 1968) und weder Thymin noch Thymidin aufgenommen werden (Grenson, 1969). Auf die Untersuchung von Mutanten, welche Thymidinmonophosphat akkumulieren können (Brendel et al., 1975; Schindler et Davies, 1975; Wickner, 1975), wurde verzichtet.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Nährlösung

Rhizocticin und weitere gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 aktive Komponenten werden zuverlässig aus Kulturen von ATCC 6633 im Komplexmedium nach Tschen nachgewiesen. Bei unvollkommen definierten Nährmedien ist jedoch mit zwei Arten von Schwierigkeiten zu rechnen: Die Zusammensetzung kann erstens von Charge zu Charge schwanken, weil wegen fehlender Standardisierbarkeit nicht alle Ingredienzien in befriedigend gleichbleibender Qualität geliefert werden können, und sich zweitens die antibiotisch aktiven Komponenten des Rhizoctonia-Faktors nur schwer von ähnlichen niedermolekularen Begleitstoffen aus dem Sojamehl oder dem Hefeextrakt trennen lassen. Aus diesen Gründen wurde nach einem chemisch definierten Nährmedium gesucht.

In einem chemisch definierten Medium nach Landy wuchs ATCC 6633 zwar, doch konnten nur sehr geringe Hemmwirkungen beobachtet werden. Das Medium nach Landy wurde deshalb durch verschiedene Stickstoffquellen supplementiert und in einer folgenden Versuchsreihe die Kohlenstoffquelle variiert.

3.1.1. Supplementation mit verschiedenen Stickstoffquellen

Die Aktiviät gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 erhöhte sich durch jede geprüfte zusätzliche Stickstoffgabe (Abb.1). Gute Ergebnisse wurden mit den Aminosäuren Arginin und Asparagin (Säulenpaare 6 und 7) erzielt. Die Hemmstoffproduktion stieg gegen-

über dem nicht supplementierten Medium etwa um den Faktor 10. Da die Isolierung von Rhizocticin (argininhaltige Verbindung; vgl. hierzu 3.4.3. und 3.4.8.) durch Arginin wesentlich erschwert werden könnte, wurde in späteren Versuchen L-Medium mit 1 g/l Asparagin verwendet.

3.1.2. Variation der Kohlenstoffquelle

In Abbildung 2 ist die Eignung einiger Kohlenstoffquellen bei Konzentrationen von 20 g/l in einem Basalmedium nach Landy mit bzw. ohne Asparaginzusatz wiedergegeben. Die höchste antifungische Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 wurde hierbei im Ansatz mit Mannit als Kohlenstoffquelle unter Zusatz von 1 g/l Asparagin detektiert.

Höhere Glucose-Konzentrationen wirkten auf die Hemmstoffbildung reprimierend (Abb. 3), was auf eine Katabolitrepression hinweist. Mannit in Konzentrationen bis 20 g/l übte diesen unerwünschten Effekt nicht aus (Abb. 4). Mit Glycerin als Kohlenstoffquelle (nicht abgebildet) glich der Effekt dem des Mannits, doch traten in diesem Fall Unregelmäßigkeiten in der Antibiotikaproduktion auf.

In den folgenden Versuchen wurde Mannit in einer Konzentration von 20 g/l als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

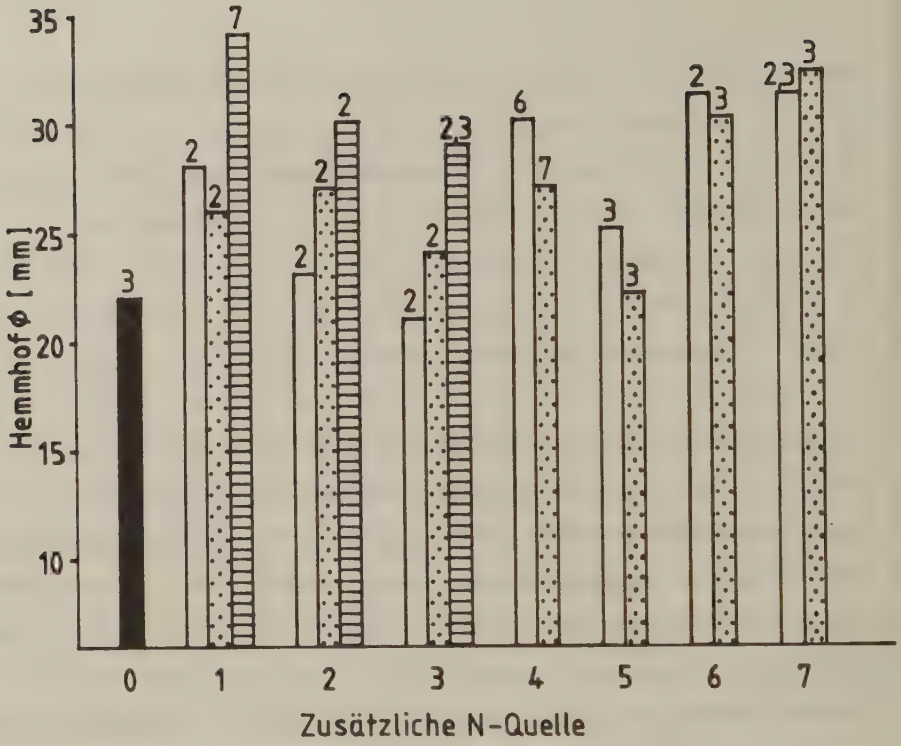

Abb. 1: Produktion von Rhizocticin und weiteren Komponenten des Rhizoctonia-Faktors in L-Medium mit zusätzlicher Supplementierung durch verschiedene Stickstoffquellen.

Ordinate: Hemmung von *Paecilomyces variotii* Tü 137.
Abszisse: Zusätzliche Stickstoffquellen und deren Konzentration. Die Ziffern auf den Balken geben den Tag des Produktionsmaximums an.

1 Sojamehl
2 Fleischmehl
3 Hefeextrakt
4 Cystein
5 Methionin
6 Asparagin
7 Arginin

0 L-Medium ohne N-Zusatz
0,1 %
0,2 %
0,5 %

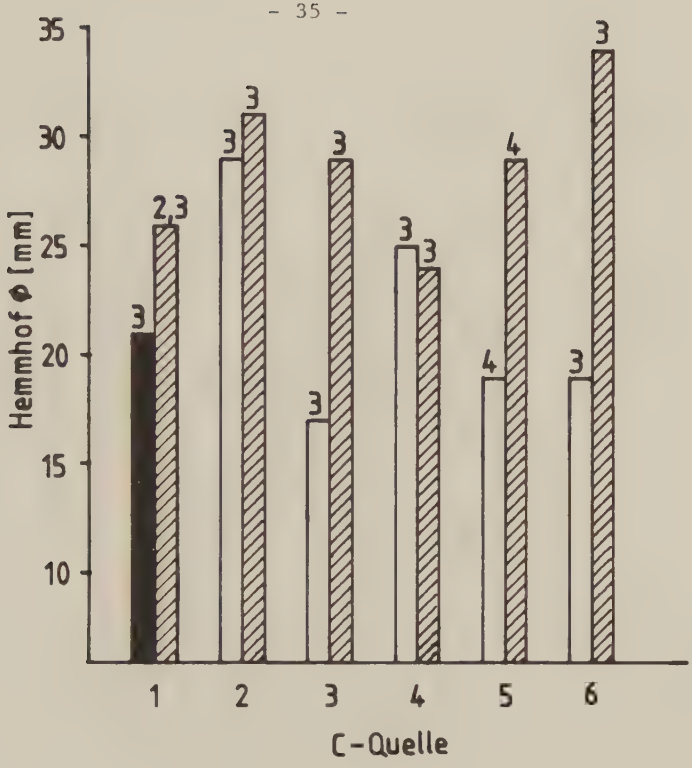

Abb. 2: Produktion von Rhizocticin und weiteren Komponenten des Rhizoctonia-Faktors in definierten Nährmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (jeweils 20 g/l).

Ordinate: siehe Abb.1. Abszisse: Kohlenstoffquellen mit und ohne Asparaginzusatz. Die Ziffern auf den Balken geben den Tag des Produktionsmaximums an.

1 Glucose
2 Fructose
3 Saccharose
4 Raffinose
5 Xylose
6 Mannit

■ 0 Ursprüngliches Medium nach Landy

□ C-Quelle ohne Asparagin

▨ C-Quelle incl. 0,1 % Asparagin

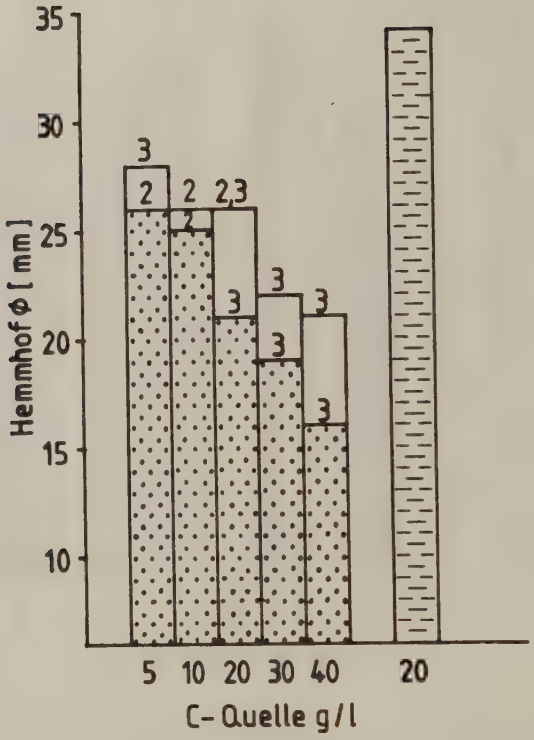

Abb. 3: Katabolitrepression durch Glucose (Basalmedium nach Landy, 27°C; Testorganismus *Paecilomyces variotii* Tü 137). Die Zahlen auf den Balken geben den Tag des Produktionsmaximums an.

Glucose

Mannit + 1 g/l Asparagin

Glucose + 1 g/l Asparagin

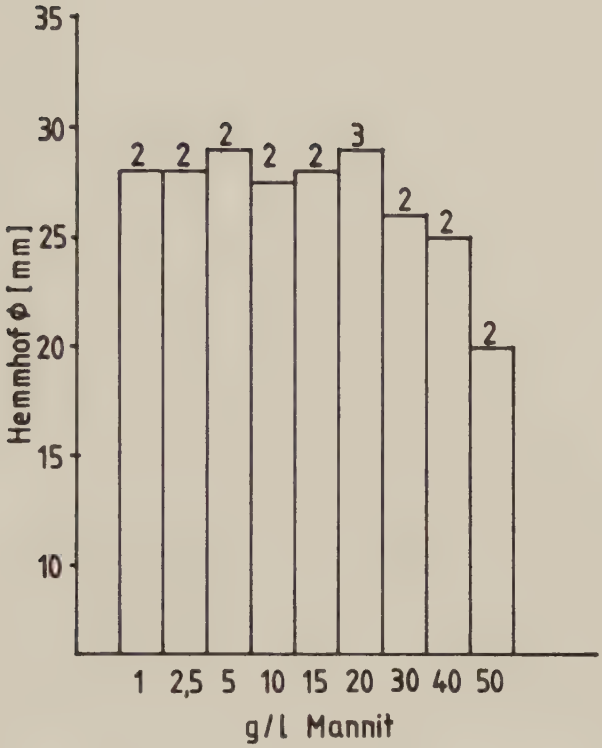

Abb. 4: Produktion von Rhizocticin bei unterschiedlichen Mannitkonzentrationen (Basalmedium nach Landy + 1 g/l Asparagin, 27°C; Testorganismus *Paecilomyces variotii*). Die Zahlen auf den Balken geben den Tag des Produktionsmaximums an.

3.2 Temperaturoptimum

Bacillus subtilis ATCC 6633 wurde in PL-Medium bei einem Temperaturgradienten von 17°C bis 42°C drei Tage lang inkubiert.
Abbildung 5 zeigt den Verlauf der Bacilysin-Bildung am ersten, zweiten und dritten Tag. Da Bacilysin von ATCC 6633 in der Trophophase gebildet wird, konnten an verschiedenen Tagen Produktionsmaxima bei unterschiedlichen Temperaturen beobachtet werden. Die höchsten auf Bacilysin zurückzuführenden Aktivitäten gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 traten am zweiten und dritten Tag zwischen 20°C und 26°C auf.
In Abbildung 6 ist der Produktionsverlauf von Rhizocticin, der Hauptkomponente des Rhizoctonia-Faktors, unter oben genannten Bedingungen am zweiten und dritten Tag dargestellt. Die Produktion des Hemmstoffes war zwischen 24°C und 28°C am ausgeprägtesten. Deshalb wurde für alle weiteren Versuche eine Inkubationstemperatur von 27°C gewählt.

3.3. Fermentation im Labor- und technischen Masstab

Die Produktion von Rhizocticin und eines weiteren hydrophilen Antibiotikums mit Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 erfolgte in Schüttelkulturen und in verschiedenen Rührkesseln im 10, 25 und 200 l-Maßstab.
Wegen der stärkeren Schaumentwicklung und der weit geringeren Produktion an antifungischen Hemmstoffen in Fermentern mit radialfördernden Schaufelrührern wurden Reaktoren mit Intensor-Umwurfsystemen bevorzugt.

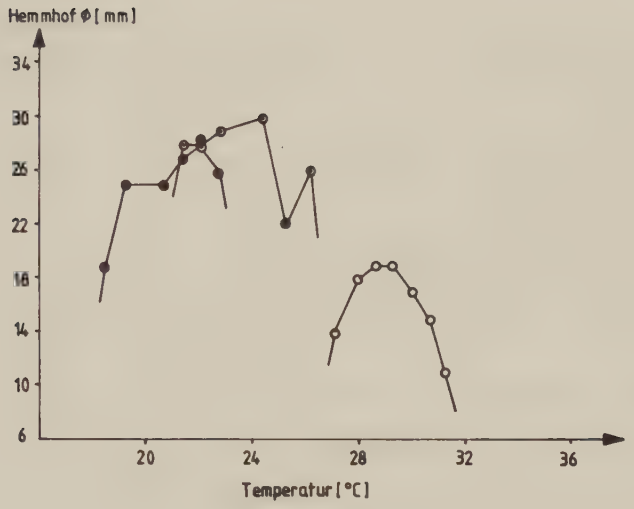

Abb. 5: Bacilysin-Produktion im Temperaturgradienten (PL-Medium; Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125).
○ 1. Tag, ⊙ 2. Tag, ● 3. Tag.

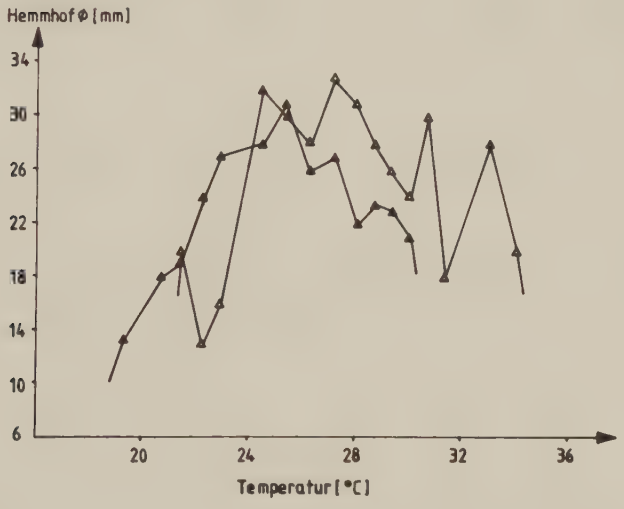

Abb. 6: Rhizocticin-Produktion im Temperaturgradienten (PL-Medium; Testorganismus *Paecilomyces variotii* Tü 137).
△ 2. Tag, ▲ 3. Tag.

Die stark ausgeprägte Schaumentwicklung durch den Rhizocticin-Produzenten konnte bei den 25 l-Umwurffermentern durch mehrmalige Polyol-Zugabe und bei der Fermentation im 200 l-Maßstab durch über eine Schaumsonde gesteuerte Zugaben des Antischaummittels reduziert werden.

Abbildung 7 zeigt den typischen Verlauf einer unter Standardbedingungen mit definiertem Produktionsmedium durchgeführten Fermentation im 25 l-Maßstab. Eine weitgehend auf der Bildung von Bacilysin basierende Aktivität gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 trat innerhalb der Trophophase auf. Die hauptsächlich auf Rhizocticin zurückzuführende Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 erreichte in Korrelation mit der Zellmasse zwischen 45 und 90 Stunden bei pH-Werten zwischen 6,2 und 7,3 ihren Maximalwert und nahm in der Folge annähernd kontinuierlich ab.

Bei der Fermentation im 200 l-Maßstab mit definiertem Produktionsmedium trat das Maximum der Rhizocticin-Produktion zwischen 55 und 80 Stunden bei pH-Werten zwischen 6,5 und 7,5 nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle ein (Abb. 8),

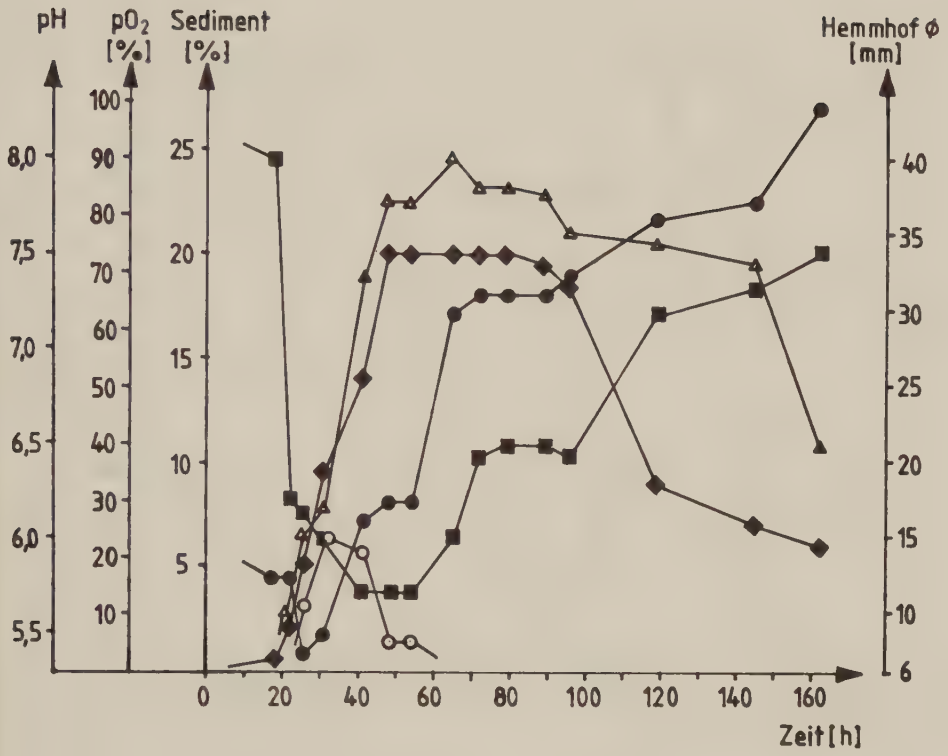

Abb. 7: Fermentation von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 im 20 l-Maßstab (PL-Medium, 27°C).
△—△ Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 (mm Hemmhofdurchmesser), ○—○ Aktivität gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 (mm Hemmhofdurchmesser), ◆—◆ Sediment (%), ●—● pH, ■—■ pO_2 (%).

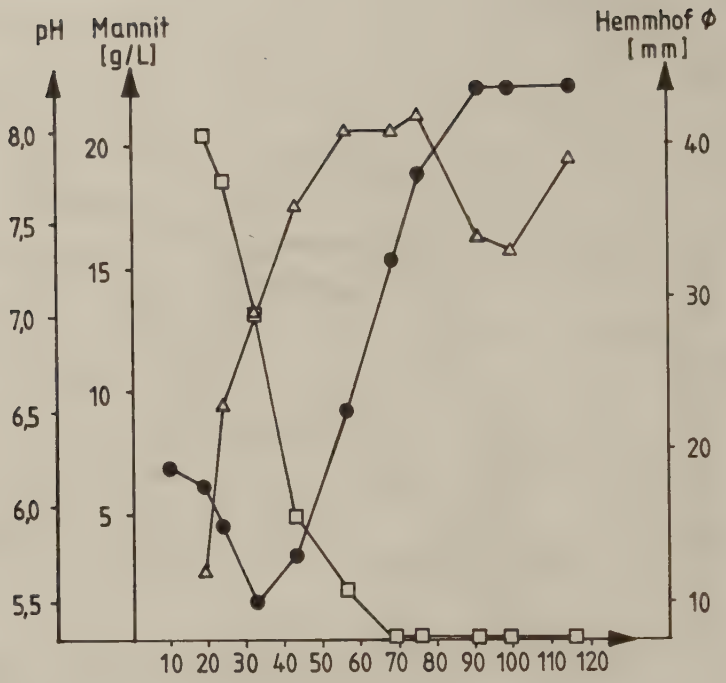

Abb. 8: Fermentation von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 im 200 l-Maßstab (PL-Medium, 27°C).
△—△ Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 (mm Hemmhofdurchmesser), ●—● pH, □—□ Mannitgehalt (g/l).

3.4. Chemisch-physikalische Charakterisierung von Rhizocticin

3.4.1. Dünnschichtchromatographische Charakteristika

Rhizocticin wurde in verschiedenen Fließmittelsystemen chromatographiert. Die R_f-Werte des Rhizocticins in den einzelnen Laufmitteln sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: R_f-Werte des Rhizocticins in Dünnschichtchromatogrammen mit Kieselgel 60_{F254} und verschiedenen Fließmittelsystemen.

Laufmittel		R_f-Werte
Chlorofom/Methanol/15 % Ammoniak	(2/2/1)	0,35
Butanol/Eisessig/Wasser	(4/3/3)	0,13
Chloroform/Methanol/Wasser	(65/25/4)	0,03
Butanol/Aceton/Wasser	(16/24/4)	0,04

3.4.2. Nachweis von Rhizocticin mit verschiedenen Sprühreagenzien

Dünnschichtchromatogramme von Rhizocticin wurden mit verschiedenen Nachweisreagenzien besprüht. Es zeigte sich keine Reaktion mit Anthron-Schwefelsäure, Brom-Schwefelsäure, Salzsäure-Methanol

(1:1); Ehrlichs Reagenz, Molybdatophosphorsäure, Orcin-Eisen (III)-chlorid-Schwefelsäure und Tetrazoliumblau. Positive Farbreaktionen, die hinsichtlich des R_f-Wertes mit der Zone der antifungischen Aktivität identisch waren, ergaben sich mit Chlor-TDM (blaugrüner Fleck) und mit 8-Hydroxychinolin-Hypobromit (Sakaguchi-Reagenz), einem Nachweisreagenz für Guanidinogruppen (rötlicher Fleck). Mit Ninhydrin als Sprühreagenz konnte Rhizocticin nur in sehr hohen Konzentrationen als fahler Fleck auf rötlich-bläulichem Hintergrund detektiert werden.

3.4.3. Verhalten in der Hochspannungselektrophorese

Die Hauptaktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 aus dem um den Faktor 10 angereicherten Kulturfiltrat von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 wanderte noch bei pH 11 zur Anode.
Über pH 10,6 liegt unter den basischen Aminosäuren nur noch die Guanidino-Gruppe des Arginins (pK-Wert 12,5) in dissoziiertem Zustand vor. Aus diesem Befund kann gefolgert werden, daß Rhizocticin (vgl. hierzu 3.4.8.) und ähnliche Verbindungen Hauptbestandteile des Gemisches antifungischer Substanzen mit Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 sind.

3.4.4. pH- und Temperaturstabilität

Nach Inkubation von Rhizocticin in Puffern mit pH-Werten zwischen 2,5 und 9 bei einer Temperatur von 95°C konnte auch nach sechs Stunden keine Abnahme der Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 beobachtet werden.

3.4.5. Stabilität von Rhizocticin gegen Oxidationsmittel

Nach zweistündiger Inkubationsdauer in einer 8 %-igen Perhydrollösung trat im Vergleich mit den Kontrollen keine Aktivitätsabnahme von Rhizocticin gegenüber *Paecilomyces variotii* Tü 137 ein.

3.4.6. Löslichkeitsverhalten

Rhizocticin, ein amorphes, farbloses Pulver, ist gut löslich in Wasser, 35 % Ethanol, mäßig löslich in Methanol und unlöslich in Ethanol, höheren Alkoholen sowie in unpolaren Lösungsmitteln.

3.4.7. Aminosäurenanalyse

Nach Totalhydrolyse (6 N HCl, 24 h, 110°C) konnte mittels Ionenaustauschchromatographie (Biotronik LC 6000 E) Arginin und eine unbekannte, ninhydrin-positive Aminosäure mit dem Retentionsverhalten saurer Aminosäuren detektiert werden. Die Retentionszeit der unbekannnten Aminosäure war mit der von Cysteinsäure identisch.

Mit der gaschromatographischen Aminosäurenanalyse an Chirasil-Val konnte nach Umsetzung des Hydrolysates (6 N HCl, 24 h, 110°C) zu flüchtigen Pentafluorpropionyl/n-Propionyl-Derivaten als einzige Verbindung Pentafluorpropionyl-L-Arg-n-Propionyl gefunden werden.

3.4.8. Chemische Untersuchungen zu Rhizocticin I

Mittels HPLC (Säule: Lichrosorb-NH_2 5 U; Mobile Phase: 0,1 N KH_2PO_4) wurde ein Hydrolysat (6 N HCl, 18 h, 110°C) von Rhizocticin I (vgl. 3.4.9) in L-Arginin und die unbekannte Komponente aufgetrennt (Abb. 9). Ein Vergleich der NMR-Spektren von Rhizocticin I und der unbekannten Strukturkomponente ergibt, daß außer der Abspaltung des Arginins keine weiteren Abbaureaktionen stattfinden.

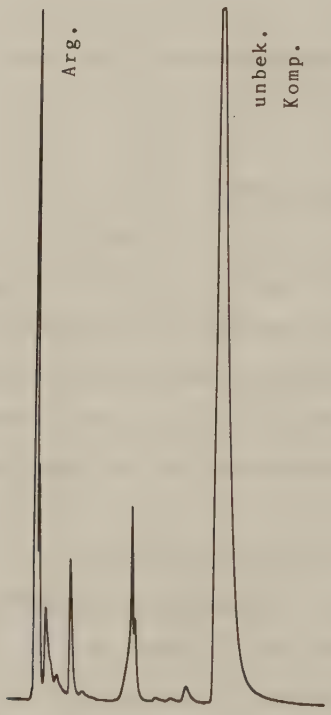

Abb. 9: HPLC-Auftrennung eines Hydrolysates von Rhizocticin I

3.4.8.1. Massenspektren von Rhizocticin I

Da Arginin üblicherweise protoniert vorliegt, ist es als wahrscheinlichster M^+-Peak 334 anzunehmen (Abb. 10). Der $(M+1)^+$-Peak und der $(M+2)^+$-Peak sind demnach 335 beziehungsweise 336.

3.4.8.2. NMR-Spektren von Rhizocticin I

Im ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 11) von Rhizocticin I können Signale von Arginin und einem unbekannten Anteil unterschieden werden. Dem unbekannten Anteil lassen sich folgende Signale zuordnen: C=O (179.7 ppm); CH- (131.1, 131.2, 128.9, 128.8, 55.7 ppm); CH_2- (32.2; 30.9 ppm).
Im ^1H-NMR-Spektrum vom Rhizocticin I (Abb. 12) sind neben den dem Arginin zuzuordnenden Signalen auch noch die Signale der unbekannten Komponente zu finden: CH- (5.9, 5.7, 4.9 ppm) und CH_2- (2.6 ppm).

3.4.8.3. Zusammenfassung der chemischen Untersuchungen zu Rhizocticin I

Bei Rhizocticin I handelt es sich um eine stabile, ungesättigte, TDM-positive Arginin-Verbindung mit einer Molmasse von 334, welche bei saurer Hydrolyse in L-Arginin und eine ebenfalls ninhydrin-positive, saure Verbindung gespalten wird. Außer der Abspaltung des Arginins finden keine weiteren Abbaureaktionen statt.

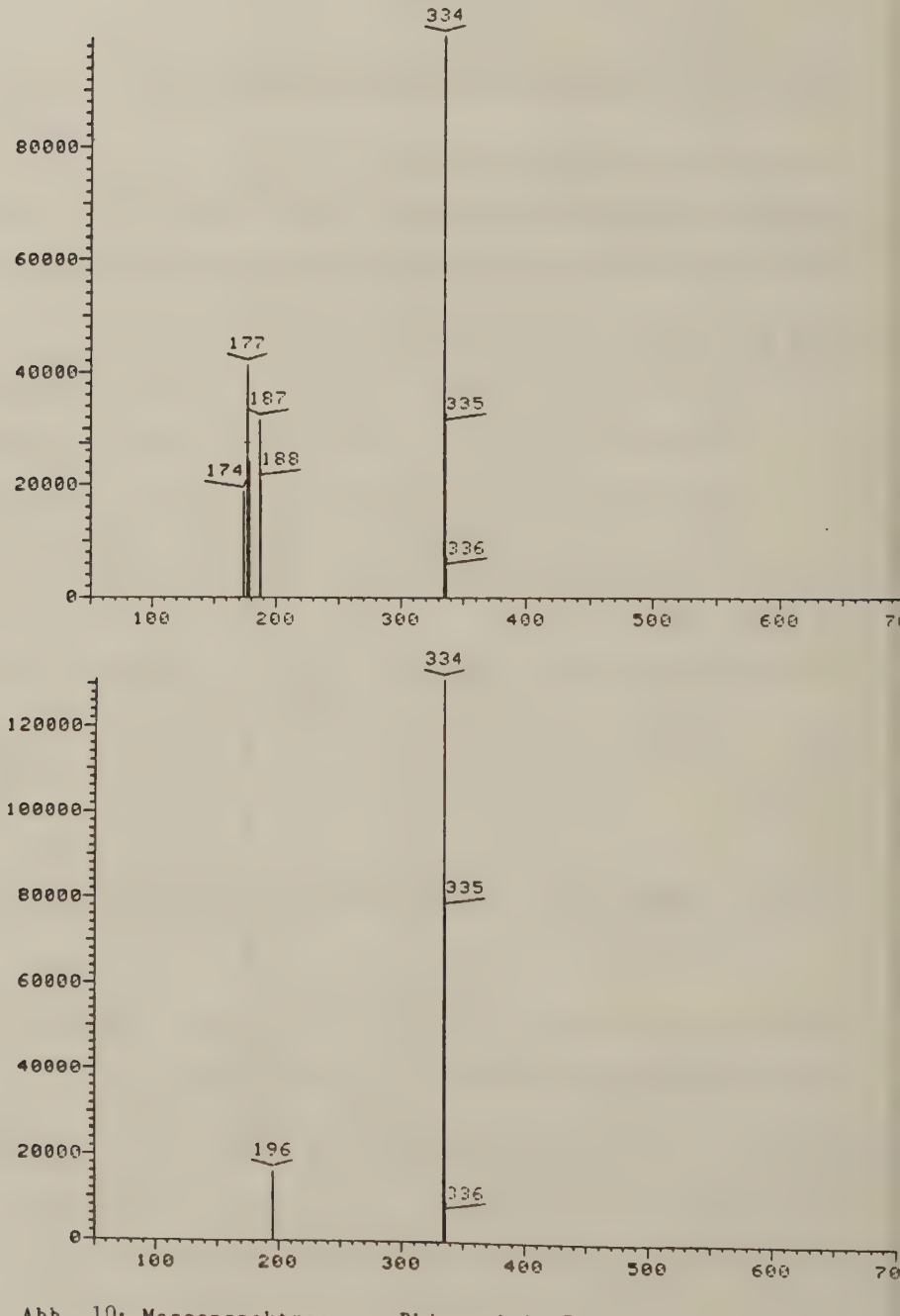

Abb. 10: Massenspektren von Rhizocticin I

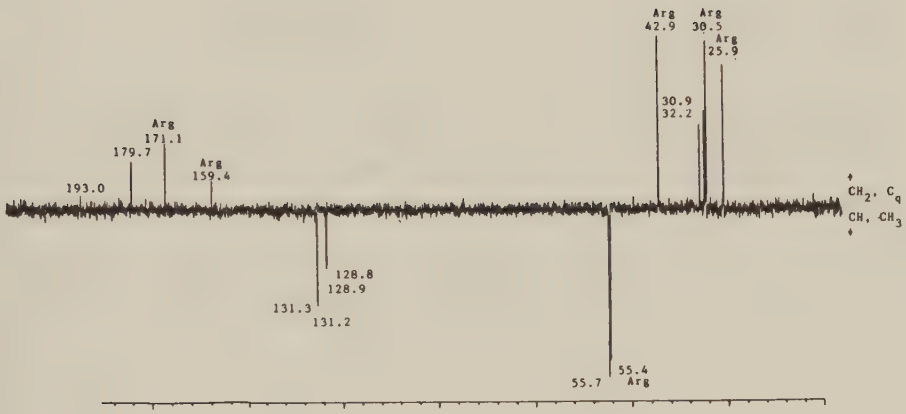

Abb. 11: ^{13}C-NMR-Spektrum von Rhizocticin I

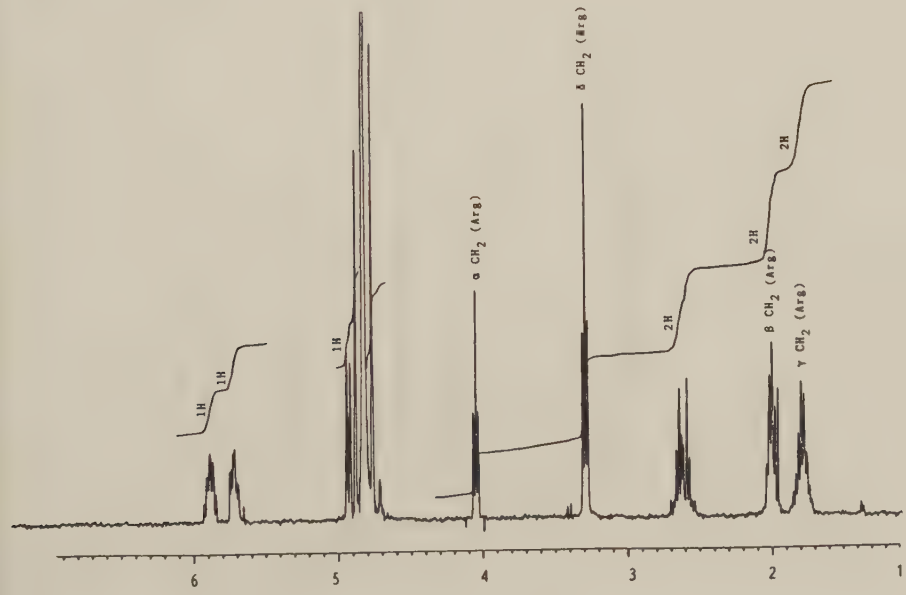

Abb. 12 : ^{1}H-NMR-Spektrum von Rhizocticin I

3.4.9. Chemische Untersuchungen zu Rhizocticin II

Rhizocticin II wurde wie Rhizocticin I aus einem Ansatz mit T-Medium isoliert. Bei der biologischen Aktivität wurde kein Unterschied zwischen Rhizocticin I und II festgestellt. Die Spektren von Rhizocticin II unterscheiden sich von Rhizocticin I durch zwei zusätzliche $-CH_2OH$-Signale, die sich sowohl im ^{13}C-NMR als auch im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.13) finden.

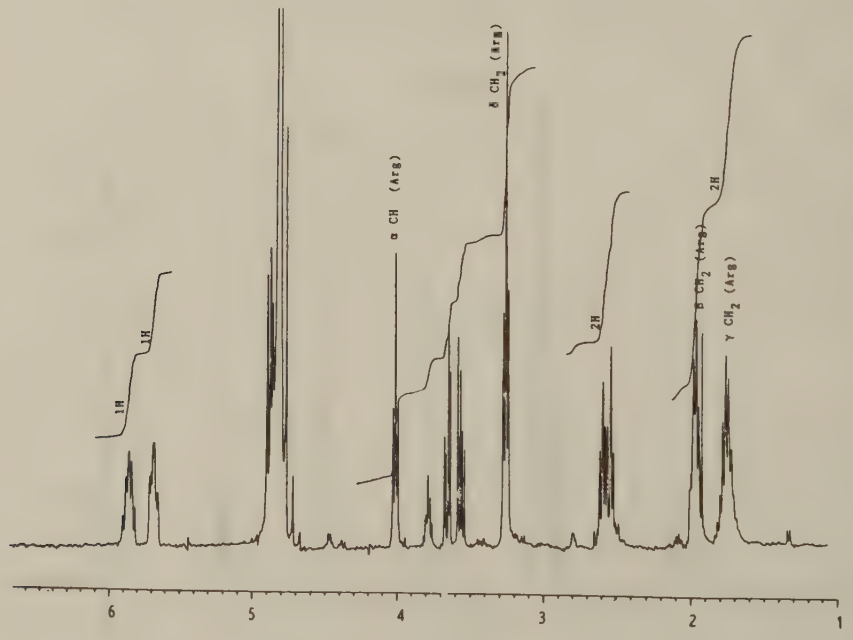

Abb. 13: ^{1}H-NMR-Spektrum von Rhizocticin II.

3.5 Biologische Charakterisierung des Rhizocticins

Für die Versuche zur biologischen Charakterisierung wurde ein nicht mittels NMR-Spektroskopie untersuchtes Rhizocticin-Präparat mit einer spezifischen Aktivität von etwa 35 % verwendet.

3.5.1 Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Rhizocticin-Konzentration

Die mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen im Plattendiffusionstest erhaltenen Hemmhofdurchmesser für *Paecilomyces variotii* Tü 137 auf Malz- und Czapek-Doz-Agar sind in Abbildung 14 dargestellt.

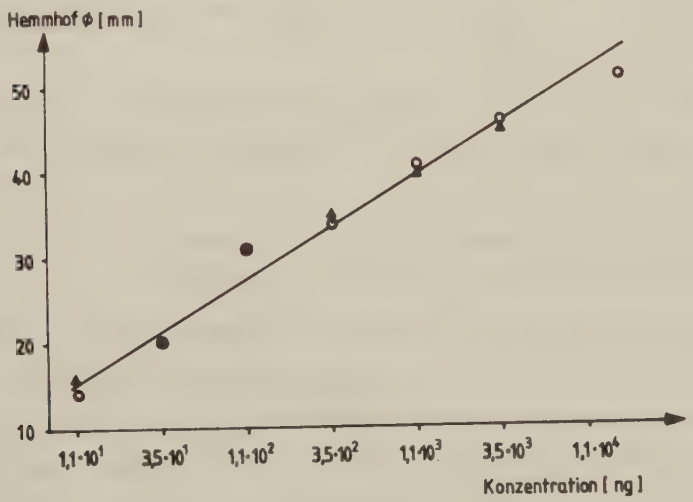

Abb. 14: Größe des Hemmhofdurchmessers bei *Paecilomyces variotii* Tü 137 in Abhängigkeit von der Rhizocticin-Konzentration in ng/Testrondelle.
○ Malzagar ▲ CD-Agar

Die untere Nachweisgrenze im Plattendiffusionstest nach 2.12. mit *Paecilomyces variotii* Tü 137 liegt für Rhizocticin bei 1,1 µg/ml. Die Bestimmung der Antibiotikakonzentration auf Czapek-Dox-Agar ist wegen der unschärferen Hemmhofgrenzen schwieriger und weniger zuverlässig als mit Malzagar-Testmedium.

3.5.2. Wirkung gegen Pilze und Bakterien

Die Rhizocticin-Empfindlichkeit verschiedener Pilze und Bakterien wurde im Plattendiffusionstest ermittelt. Zusätzlich wurde für Sproßpilze die minimale Hemmkonzentration (MIC), ferner für einen Teil der Fadenpilze die Konzentrationen, bei denen das Wachstum einer Pilzkolonie um 10 % (IC 10), 50 % (IC 50) sowie total (MIC) gehemmt werden, nach 2.13. bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

Rhizocticin zeigte in den getesteten Konzentrationen (0,35 mg/ml) keine Wirkung auf Prokaryonten. Besonders sensitive Pilze waren nach dem Rondellentest *Paecilomyces variotii*, *Ascodesmis sphaerospora*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomycopsis lipolytica*. Als weitgehend insensitiv erwiesen sich *Ustilago maydis*, *Rhodotorula rubra*, *Entomophthora coronata*, *Aspergillus terreus*, *Epidermomyces floccosus*, *Microsporum gypseum*, die zwei getesteten Species der Gattung *Cladosporium* sowie sämtliche andere geprüften Dematiaceae. *Rhizoctonia solani* war im Test an der Riesenkolonie unempfindlich, erwies sich jedoch im Test nach 2.13.1. als sehr empfindlich.

Tabelle 2: Antifungische Wirkung des Rhizocticins gegen Pilze (Malzmedium).

Hemmhoftyp:

n sehr schwach bewachsen

W schwach bis mittelstark bewachsen

W+ stark bewachsen

* Test an der Riesenkolonie

Pilze	Hemmhofdurchmesser (mm) bei pro Rondelle aufgetragener Menge (ng) $3{,}5 \cdot 10^3$	$1{,}1 \cdot 10^3$	$3{,}5 \cdot 10^2$	$1{,}1 \cdot 10^2$	$3{,}5 \cdot 10^1$	$1{,}1 \cdot 10^1$	Hemmhof-typ	MIC	IC 50 (µg/ml)	IC 10
Zygomycota										
Basidiobolus microsporus	48	39	34				n			
Entomophthora coronata	35						W+			
Mycotypha africana	22	17,5	13	10			W			
Rhizomucor miehei	32	27	23	21			W	>3,5	>3,5	0,11
Ascomycota und Deuteromycota										
Endomycetes und zugeordnete Blastomycetes										
Candida albicans	21	19	13				W	~3,5		
Candida guilliermondii	19	14	+				n	>3,5		
Dipodascus magnusii	32	26	14				n	>3,5		
Nematospora coryli	49	40	31				W+	>3,5		
Saccharomyces cerevisiae	25	21,5	17	12,5			n	~0,35		
Saccharomycopsis lipolytica	37	33,5	28	23	17	+	n	0,35		
Schizosaccharomyces pombe	54	48	23,5	23,5	+		n	0,35		

PILZE	Hemmhofdurchmesser (mm) bei pro Rondelle aufgetragener Menge (ng) $3,5 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^1$	Hemmhof-typ	MIC	IC 50 (µg/ml)	IC 10
Eurotiales und zugeordnete Deuteromycota										
Aspergillus fumigatus	29	24	19	+			W			
Aspergillus terreus	20						W			
Paecilomyces variotii	46	41	34	31	20	14	n	>3,5	1,1	0,11
Penicillium notatum	36	26	20	+			W			
Onygenales und zugeordnete Deuteromycota										
Epidermomyces floccosus	+						W+			
Microsporum gypseum								>3,5	>3,5	0,11
Trichophyton erinacei	44	37	23				W	>3,5	>3,5	0,11
Trichophyton mentagrophytes	39	27	17				W+			
Trichophyton rubrum	44	28	15				W	>3,5	>3,5	3,5
Sphaeriales und zugeordnete Deuteromycota										
Fusarium sp. Tü 8014	17,5	14	11				n			
Sordaria macrospora	35	20	+				n			

PILZE	Hemmhofdurchmesser (mm) bei pro Rondelle aufgetragener Menge (ng) $3,5 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^1$	Hemmhof-typ	MIC	IC 50 (µg/ml)	IC 10
Pezizales										
Ascobolus carbonarius	28						*			
Ascodesmis sphaerospora	52	47	39	33	19		n	3,5	0,35	0,035
Plicaria anthracina	37	25	25				*	3,5	0,35	0,035
Dothideales und zugeordnete Deuteromycota										
Alternaria kikuchiana	38	30	19	+			W			
Cladosporium carrionii Nr.1	17						W+			
Cladosporium trichoides Nr.3,4	-									
Curvularia lunata	28	18	14				W			
Stemphylium sarciniforme	44	37	29	20			W			
Stemphylium sp. Tü 609	42	34	27	24			n			
Dematiaceae (Schwärzepilze) ungewisser Zuordnung										
Exophiala mansonii Nr. 5,6,10	-						W+			
Exophiala werneckii	16						W+			

Pilze	Hemmhofdurchmesser (mm) bei pro Rondelle aufgetragener Menge (ng) $3,5 \cdot 10^3$ $1,1 \cdot 10^3$ $3,5 \cdot 10^2$ $1,1 \cdot 10^2$ $3,5 \cdot 10^1$ $1,1 \cdot 10^1$	Hemmhof-typ	MIC	IC50 (µg/ml)	IC 10
Rhinocladiella compacta	15	W+			
Rhinocladiella pedrosoi	16	W+			
Basidiomycota und zugeordnete Deuteromycota					
Rhizoctonia solani	-	*	~3,5	0,35	0,11
Rhodotorula rubra	+	W+	>3,5		
Ustilago maydis	-		>3,5		

Tabelle 3: Rhizocticin-unempfindliche Prokaryonten (keine Hemmung bei Prüfung gegen 3,5 µg Rhizocticin pro Rondelle).

	Medium, Temperatur (°C)
GRAM-POSITIVE BAKTERIEN	
Arthrobacter aurescens	NB, 27
Arthrobacter oxydans	NB, 27
Bacillus cereus	nHA, 37
Bacillus subtilis	Ox, MB, 37
Brevibacterium flavum	Ox, 37
Clostridium pasteurianum	Clost, 27
Corynebacterium insidiosum	Ox, 27
Micrococcus luteus	NB, 27
Staphylococcus aureus	Ox, 37
Streptomyces glaucescens	nHA, 27
Streptomyces violaceoruber	nHA, 27
Streptomyces viridochromogenes	nHA, 27
GRAM-NEGATIVE BAKTERIEN	
Achromobacter geminiani	nHA, 37
Escherichia coli	Ox, MB, 37
Proteus mirabilis	NB, 37
Proteus vulgaris	NB, 37
Pseudomonas fluorescens	NB, 27
Salmonella typhimurium	nHA, 37

3.5.3. Wirkung gegen Protozoen

Die Lokomotion von *Paramecium caudatum* war auch in der höchsten getesteten Konzentration von 35 µg/ml Rhizocticin gegenüber der Kontrolle unverändert.

3.5.4. Wirkung gegen Nematoden

Im Test gegen *Caenorhabditis elegans* wirkte Rhizocticin in Konzentrationen bis 10 µg/ml innerhalb zwei Tagen letal gegen alle Nematoden. Bei einer Rhizocticin-Konzentration von 3,5 µg/ml war nach zwei und sechs Tagen die Bewegung der Nematoden gegenüber der Kontrolle reduziert. Durch 150 µg/ml Threonin konnte die toxische Wirkung von 10 µg/ml Rhizocticin nicht aufgehoben werden.

3.5.5. Phytotoxizität

Lediglich bei 70 µg/ml Rhizocticin konnte eine geringfügige Hemmung des Wurzelwachstums von *Lepidium sativum* gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Unter dem Einfluß von 14 µg/ml Rhizocticin entwickelte sich *Vicia faba* ohne sichtbare Schäden.

3.5.6. Mitogene Wirkung und Toxizität gegen Mäuselymphocyten

Im Lymphocyten-Mitogenitätstest nach Johnson und Mitarbeitern (1983) zeigte Rhizocticin im Konzentrationsbereich von 0,7 ng/ml bis 170 µg/ml verglichen mit Concanavalin A keine mitogene Wir-

kung (Abb. 15). Auch bei der höchsten getesteten Konzentration konnte keine Schädigung der Lymphocyten beobachtet werden.

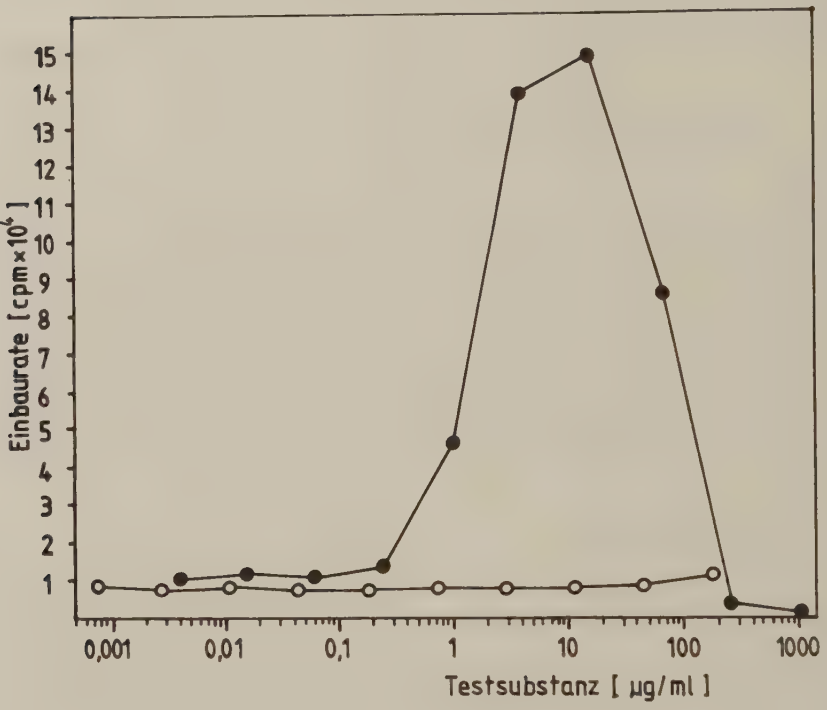

Abb. 15: Einbau von ^{3}H -Thymidin in die DNA von Mäuselymphocyten nach Behandlung mit Rhizocticin und Concanavalin A.

○ Rhizocticin
● Concanavalin A

3.5.7. Inaktivierende Wirkung von Pilzkolonien auf Rhizocticin

Malzagar-Platten (10 µg/ml Rhizocticin) wurden mit einer Pilzkolonie entweder von *Ascodesmis sphaerospora*, einem Rhizocticin-sensitiven Testorganismus, oder von *Stemphylium* Tü 609, einem auf Malzmedium langsam wachsenden Pilz, zentral beimpft und mehrere Tage inkubiert (vgl. hierzu 2.13.1.). Anschließend wurden Agarzylinderstückchen (5 mm Durchmesser) im Abstand von 7 bzw. 22 mm zum Zentrum ausgestochen und im Agardiffusionstest auf Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 getestet. Die in der Nähe der Pilzkolonien ausgestochenen Agarstückchen waren um ungefähr den Faktor 10 weniger aktiv als die weiter entfernt ausgestochenen Agarstückchen, ferner war die antifungische Aktivität der Agarstückchen aus *Ascodesmis sphaerospora*-Platten höher als aus Platten von *Stemphylium* Tü 609.

3.5.8. Abhängigkeit der antibiotischen Wirkung vom Zeitpunkt der Antibiotikumszugabe

Die Abhängigkeit der antifungischen Wirkung auf eine wachsende Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* vom Zeitpunkt der Rhizocticin-Zugabe ist in Abbildung 16 dargestellt. In den Abbildungen 16, 18 und 19 fällt auf, daß bei frühzeitiger Zugabe des Antibiotikums die Transmission der Testkultur zunächst schwach zunimmt und erst danach allmählich abnimmt. Vor der Wirkung von Rhizocticin tritt also Zellwachstum ein.

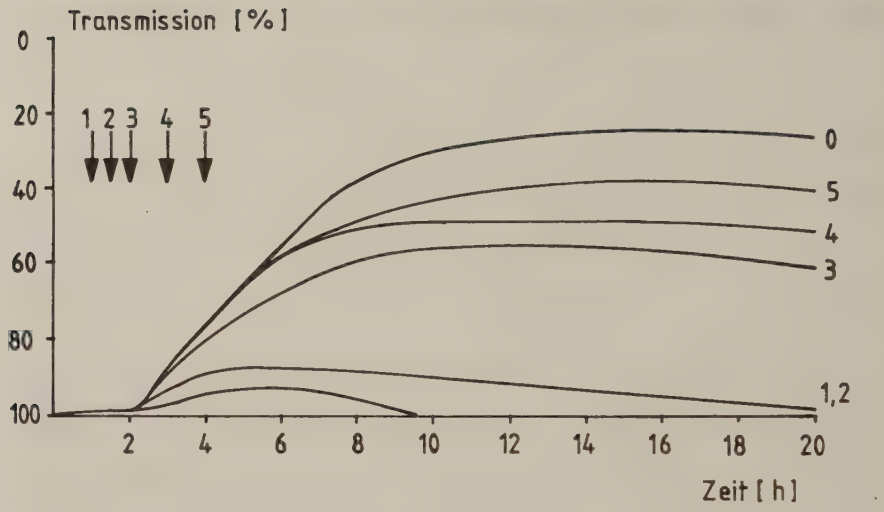

Abb. 16: Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 in Malzmedium (27°C) bei Zugabe von 10 µM Rhizocticin zu unterschiedlichen Zeitpunkten 1-5 (↓); Kontrolle ohne Antibiotikum (0).

3.5.9. Fungizide Wirkung

Unter dem Einfluß von 10 µM Rhizocticin nahm in einer Schüttelkultur mit wachsenden *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen die Lebendkeimzahl drastisch ab (Abb. 17). Die in Verdünnungsreihen mit 10^{-1} M Saccharoselösung und mit deionisiertem Wasser ermittelten Lebendkeimzahlen unterschieden sich nur sehr geringfügig. Dies kann als ein Hinweis darauf gewertet werden, daß durch Rhizocticin die Rigidität der Zellwand nicht beeinträchtigt wird. Innerhalb der ersten Stunde blieb die Lebendkeimzahl weitgehend kon-

stant. Die fungizide Wirkung trat erst nach einer längeren Inkubationsdauer ein. Die Lebendkeimzahl nahm nach drei Stunden um über zwei Zehnerpotenzen ab und blieb dann für mehrere Stunden konstant.

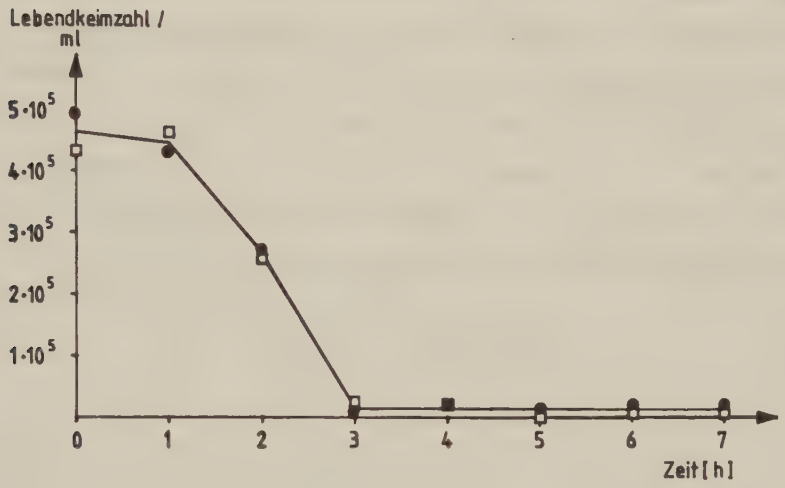

Abb. 17: Fungizide Wirkung von 10 µM Rhizocticin auf eine *Saccharomyces cerevisiae*-Kultur (27°C, MA-Medium). Lebendkeimzahlbestimmung in

□ 0,1 M Saccharoselösung
● deionisiertem Wasser

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß von Rhizocticin auf hungernde *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen untersucht. Hierzu wurden in Malzmedium über Nacht gewachsene Zellen unter sterilen

Bedingungen abzentrifugiert, mit 0,1 M NaCl-Lösung gewaschen, erneut abzentrifugiert und in Saline resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend 1,5 Stunden lang bei 27°C auf der oszillierenden Schüttelmaschine inkubiert. Die Kultur wurde nach Ablauf dieser Frist in zwei Ansätze aufgeteilt, mit und ohne Antibiotikumzugabe (Endkonzentration 10 µM) auf dem Schüttler inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Lebendkeimzahl/ml ermittelt. Im Ansatz mit Antibiotikum lag nach sieben Stunden die Lebendkeimzahl geringfügig unter dem Kontrollwert.

Da Rhizocticin auf hungernde Zellen deutlich schwächer wirkt, wird angenommen, daß die Hemmung durch Rhizocticin vom metabolisch aktiven Zustand der Zelle abhängig ist.

3.5.10. Aufhebung der Hemmung durch Aminosäuren

Die Wirkung von Rhizocticin auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 wurde im Kreuztest nach 2.12.4. durch L- und D-Cystin, L-Threonin und L-Homoserin sowie durch höhere Konzentrationen an L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Asparaginsäure aufgehoben (Tab. 4).
Mit Ausnahme von Homoserin wurde die Wirkung von Rhizocticin auf *Paecilomyces variotii* Tü 137 durch die gleichen Aminosäuren antagonisiert.

Tabelle 4: Kompetition von 0,31 mM Rhizocticin durch verschiedene Aminosäuren im Kreuztest mit *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 (MA-Medium, 27°C).
* nicht näher charakterisierbare Aufhebung

Aminosäuren	Konzentration (mM)	Aufhebungsbild
Cystin	3,16	kompetitiv
	1,0	nicht kompetitiv
	0,316	*
Threonin	10	nicht kompetitiv
	3,16	*
Homoserin	10	nicht kompetitiv
Tryptophan	10	nicht kompetitiv
Tyrosin	3,16	*
Asparaginsäure	10	*

In Biophotometerversuchen mit *Saccharomyces cerevisiae* als Testorganismus wurde die Wirkung von 1 µM Rhizocticin durch 31,6 µM L-Cystin annähernd vollständig und durch 10 µM L-Cystin teilweise aufgehoben (Abb. 18). Ferner antagonisierten in Biophotometerversuchen (nicht abgebildet) 100 µM L-Threonin, 500 µM L-Tryptophan oder L-Tyrosin 1 µM Rhizocticin.

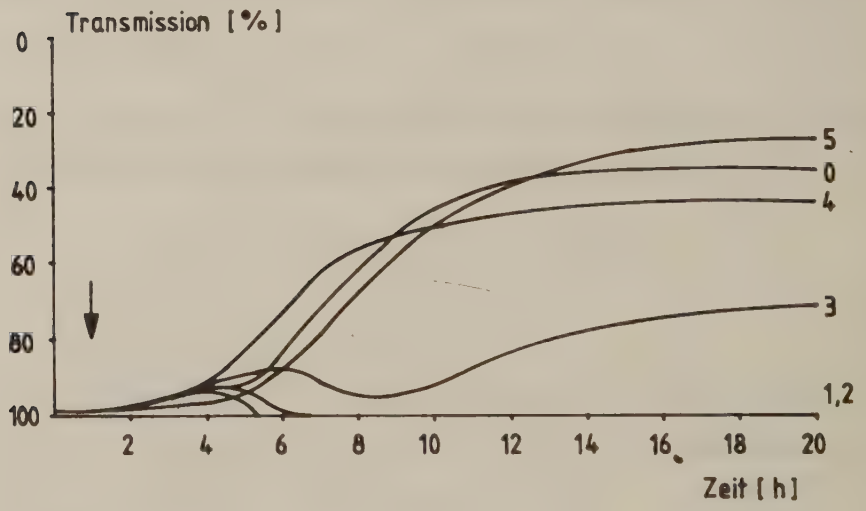

Abb. 18: Aufhebung der Rhizocticin-Hemmwirkung durch L-Cystin bei *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 (MA-Medium, 27°C).

0	Kontrolle
1	1 µM Rhizocticin
2	1 µM Rhizocticin + 3,16 µM Cystin
3	1 µM Rhizocticin + 10 µM Cystin
4	1 µM Rhizocticin + 31,6 µM Cystin
5	1 µM Rhizocticin + 100 µM Cystin

Der Zeitpunkt der Threoninzugabe entscheidet, ob die Wirkung von Rhizocticin aufgehoben wird (Abb.19). Bei Zugabe des Antagonisten bis zu 1,5 Stunden nach Zusatz des Antibiotikums konnte die Rhizocticin-Wirkung auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 aufgehoben werden. Nach 4,5 Stunden waren die Zellen der Hefekultur so stark geschädigt, daß die antifungische Wirkung nicht mehr durch Threonin aufgehoben werden konnte.

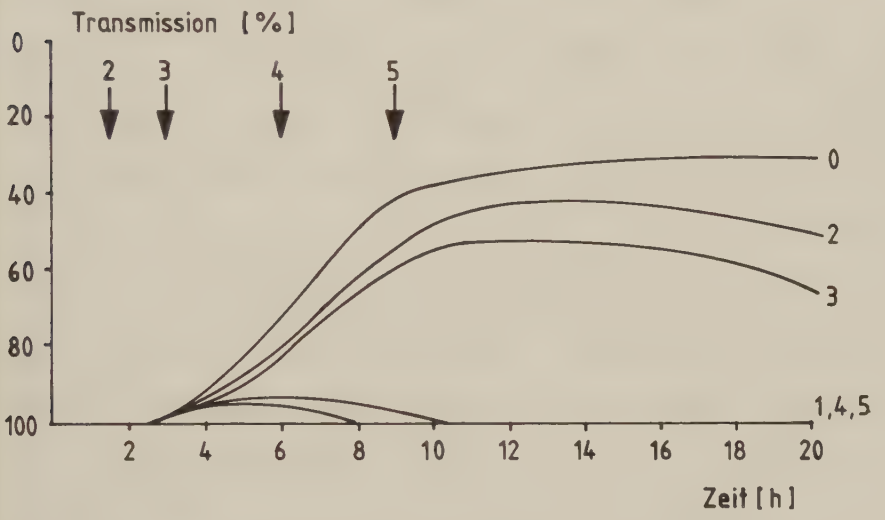

Abb. 19: Aufhebung der Hemmwirkung von 1 µM Rhizocticin durch Zugabe von 10 mM L-Threonin zu verschiedenen Zeitpunkten (2-5) bei *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 (MA-Medium, 27°C).

0	Kontrolle
1	Rhizocticin (2)
2	Rhizocticin (2) + Threonin (2)
3	Rhizocticin (2) + Threonin (3)
4	Rhizocticin (2) + Threonin (4)
5	Rhizocticin (2) + Threonin (5)

3.5.11. Kompetition durch Peptide

Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen chemischer Untersuchungen handelt es sich bei Rhizocticin wahrscheinlich um ein Dipeptid.

Von *Saccharomyces cerevisiae* werden nur Peptide mit bestimmter Aminosäuresequenz aufgenommen (Becker et al., 1973; Naider et al., 1974; Marder et al., 1977; Nisbet & Payne, 1979b; Parker et al., 1980). Nach Marder und Mitarbeitern (1978) konkurrieren hierbei sowohl Di- als auch Tripeptide um einen gemeinsamen Aufnahmeort. Auch Bacilysin (Nisbet & Payne, 1979a) und L-Ethionyl-L-Alanin (Marder et al., 1978) können über dieses Aufnahmesystem aufgenommen werden.

In Antagonisierungsversuchen mit verschiedenen Di- und Oligopeptiden konnte die Rhizocticin-Wirkung auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 und *Paecilomyces variotii* Tü 137 durch einen Teil der getesteten Peptide aufgehoben werden (Tabelle 5). Da die Aufhebung durch Threonin sowie in höheren Konzentrationen durch Homoserin, Asparaginsäure, Tryptophan und Tyrosin erfolgt, verschiedene antagonisierende Peptide jedoch keine dieser Aminosäuren enthalten, liegt der Schluß nahe, daß Rhizocticin über das Peptidtransportsystem aufgenommen wird.

3.5.12. Aufnahme von Rhizocticin in die Zelle und Beeinflussung des Transports durch L- und D-Cystin

Nisbet und Payne (1979) isolierten die Bacilysin-resistente *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante Σ1278b.gpp$^-$. Sie konnten zeigen,

Tabelle 5: Antagonismustest mit Rhizocticin (0,11 mg/ml) und verschiedenen Di- und Oligopeptiden (1 mg/ml).

	Saccharomyces cerevisiae Tü 125	*Paecilomyces variotii* Tü 137
Dipeptide		
Ala-Ala	++	-
Ala-His	++	-
Arg-Leu-Acetat	+++	+++
Arg-Tyr	+++	+++
Cys-Gly	-	-
Cys-Tyr (ox. Form)	-	-
Glu-Lys	-	-
Gly-Ala	-	-
Leu-Ala	+	-
Leu-Leu	++	-
Leu-Val	++	-
Lys-Glu	+++	+
Lys-Lys	-	-
Met-Gly	++	+
Pro-Leu	+	-
Thr-Leu	*	*
Trp-Trp	+	-
Tyr-Ala	++	++
Tyr-Lys	+	-
Tri- und Tetrapeptide		
Ala-Ala-Ala	+	-
Ala-Val-Leu	++	-
Gly-Gly-Gly	-	-
Phe-Gly-Gly	++	+++
Phe-Phe-Phe	++	-
Tyr-Gly-Gly	++	++
Ala-Ala-Ala-Ala	-	-

Erklärungen: +, ++, +++ Stärke bei kompetitiver Aufhebung der Hemmung

* nichtkompetitive Aufhebung der Hemmung

\- keine Aufhebung der Hemmung

daß das für die Peptidaufnahme maßgebende Transportsystem dieser Mutante defekt ist und deshalb kein Bacilysin in das Innere der Zelle gelangen kann. Deshalb wurden die Wirkungen antifungisch aktiver Verbindungen, von denen bekannt war, daß sie über das Peptidtransportsystem eingeschleust werden, auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 und die Mutante Σ1278b.gpp$^-$ mit denen anderer antifungischer Substanzen einschließlich Rhizocticin verglichen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der Hemmwirkung des Rhizocticins und einiger anderer Antibiotika auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 und die Mutante Σ1278b.gpp$^-$ (Malzagar, 27°C).

Antifungisch aktive Substanzen	Hemmhofdurchmesser (mm) Tü 125	Σ1278b.gpp$^-$
Bacilysin (20 mg/ml)	38	-
Nikkomycin Z (1 mg/ml)	31*	-
Valclavam (1 mg/ml)	29	-
Rhizocticin (0,35 mg/ml)	23	-
Amphotericin B (5 mg/ml)	17	20
Cycloheximid (1 mg/ml)	39	43
Oxiconazol (1 mg/ml)	23*	19,5*

* Hemmhof stark bewachsen

Substanzen, die über das Dipeptidsystem aufgenommen werden, wie Bacilysin, Nikkomycin (Höhne, 1974; Dahn et al., 1976; Mc Carthy et al., 1985) und Valclavam (Peter et al., 1985; Rabenhorst et al., 1986), zeigten ebenso wie Rhizocticin keine Wirkung auf die Mutante Σ1278b.gpp⁻, während Amphotericin B, Cycloheximid und Oxiconazol beide *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme hemmten. Dieser Befund kann als Beweis für die Aufnahme von Rhizocticin über das Transportsystem für Di- und Tripeptide durch *Saccharomyces cerevisiae* herangezogen werden.
Als weiterer Hinweis auf die Aufnahme von Rhizocticin durch das Peptidtransportsystem bei Pilzen kann gelten, daß die unbekannte Strukturkomponente von Rhizocticin I (vgl. 3.4.8.) auch in Konzentrationen bis zu 0,5 mg/ml keinerlei antifungische Aktivität gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 zeigte, während Rhizocticin in diesen Konzentrationen stark antifungisch wirksam war.

Da mit *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 als Testorganismus sowohl D- als auch L-Cystin die Wirkung von Rhizocticin antagonisieren können und eine Aufnahme von D-Cystin in das Innere der Zellen auf Grund der Stereospezifität der bekannten Aminosäure- und Peptidtransportsysteme unwahrscheinlich ist, wurden im Falle von Bacilysin und Valclavam Antgonisierungsversuche mit L- und D-Cystin durchgeführt. L- und D-Cystin antagonisierten im Konzentrationsbereich, in dem sich die Rhizocticin-Wirkung aufheben läßt, auch Bacilysin und Valclavam, während L-Threonin nicht zur typischen Aufhebung führte. Dies weist darauf hin, daß es sich bei der Aufhebung der Rhizocticin-Wirkung durch Cystin um einen Transportantagonismus handelt.

3.5.13. Untersuchungen Borrelidin-resistenter Hefemutanten auf Kreuzresistenz mit Rhizocticin

Die Wirkung des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin (Keller-Schierlein, 1967) kann durch L-Threonin und L-Homoserin kompetitiv aufgehoben werden. Borrelidin ist ein spezifischer Hemmstoff der Threonyl-tRNA-Synthetase (Hütter et al., 1966; Poralla & Zähner, 1968). Nass und Poralla (1976) beschrieben 22 Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae*, welche sich in vier Gruppen einteilen ließen. In der ersten Gruppe (BOR 1) ist die Borrelidin-Resistenz eng mit dem HOM 3-Locus auf Chromosom 3 gekoppelt. Das HOM 3-Gen kodiert für die Aspartokinase, das erste Enzym in der Threoninbiosynthese (Robichon-Szulmajster et al., 1966). In Mutanten dieser Gruppe ist die intrazelluläre Threoninbiosynthese im Vergleich zum Wildtyp um mehr als das 22-fache gesteigert, da ihre Aspartokinase nicht mehr durch Threonin feedback gehemmt wird (Seibold et al., 1981). In der zweiten Gruppe von Mutanten (BOR 2) ist die Borrelidin-Resistenz mit leu 1 auf Chromsosom 7 gekoppelt. In der dritten Gruppe (BOR 3) ist die Borrelidin-Resistenz weder mit dem HOM 3- noch mit dem LEU 1-Gen gekoppelt. Die Threonyl-tRNA-Synthetase wird jedoch nicht mehr durch Borrelidin gehemmt. Bei einer rezessiven Mutante (BOR 4-VI) konnte ebenfalls keine Kopplung mit einem der getesteten Marker festgestellt werden. Die molekulare Basis der Resistenz der BOR 2- und BOR 4-Mutanten ist noch weitgehend ungeklärt.

Verschiedene Mutanten wurden auf Kreuzresistenz mit Rhizocticin getestet (Tabelle 7). Lediglich bei dem Stamm BOR 1-X konnte eine

geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Ausgangsstamm beobachtet werden.

Tabelle 7: Hemmung Borrelidin-resitenter *Saccharomyces cerevisiae*-Mutanten durch Rhizocticin im Agardiffusionstest

Teststämme	Hemmhofdurchmesser (mm) bei	
	YNB-Agar	Malzagar
D-286-2A (ade^-, his^-)	20*	41 (1, 2 d)
BOR 1-X (ade^-, his^-)	8*	29 (1 d), 42 (2d)
BOR 2-XI (ade^-, his^-)	24*	n.g.
BOR 3-XIII (ade^-, his^-)	23*	n.g.
BOR I (ade^-, his^-)	23*	n.g.
-S 288-C	n.g.	31
BOR 1	n.g.	30
BOR 2	n.g.	30

Stämme mit Aminosäure-Auxotrophien wurden mit je 30 mg/ml Adenin und Histidin supplementiert.

n.g. nicht getestet

* stark bewachsener Hemmhof

d Ablesetag

3.5.14. Untersuchungen mit einer Threonin-auxotrophen Saccharomyces cerevisiae-Mutante

Mit Leucin und Histidin (je 30 mg/l) supplementierte EMM-2- und MA-Testplatten der *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante ATCC 26432 (his^-, leu^-, thr^-) wurden nach 2.12.1. hergestellt. Anschließend wurde im Kreuztest untersucht, ob bei diesem Stamm eine Kompetition zwischen 0,31 mM Rhizocticin und 8 mM Threonin auftritt. Auch in den Randzonen des Wachstumshofes um den Threonin-haltigen Filterstreifen trat jedoch keinerlei Hemmung von *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26432 durch Rhizocticin auf.
Auf mit allen drei Aminosäuren supplementierten MA-Testplatten der Mutante zeigte 0,5 mg/ml Valclavam im Gegensatz zu Rhizocticin eine starke antifungische Wirkung.

3.5.15. Wirkung von Rhizocticin auf die RNA- und Proteinbiosynthese

Bei einer Konzentration von 12 µM Rhizocticin konnte während eines Zeitraumes von 20 Minuten keine selektive Abnahme der Einbaurate von C^{14}-markiertem Uracil oder Phenylalanin in die RNA und Proteine von *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (Abb. 20). Eine schwache, unspezifische Abnahme der Biosynthese beider Makromoleküle trat nach 20 Minuten auf.
Herrn Prof. Dr. H. Wolf möchte ich für die Hilfe bei den Einbauversuchen und seine ständige Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

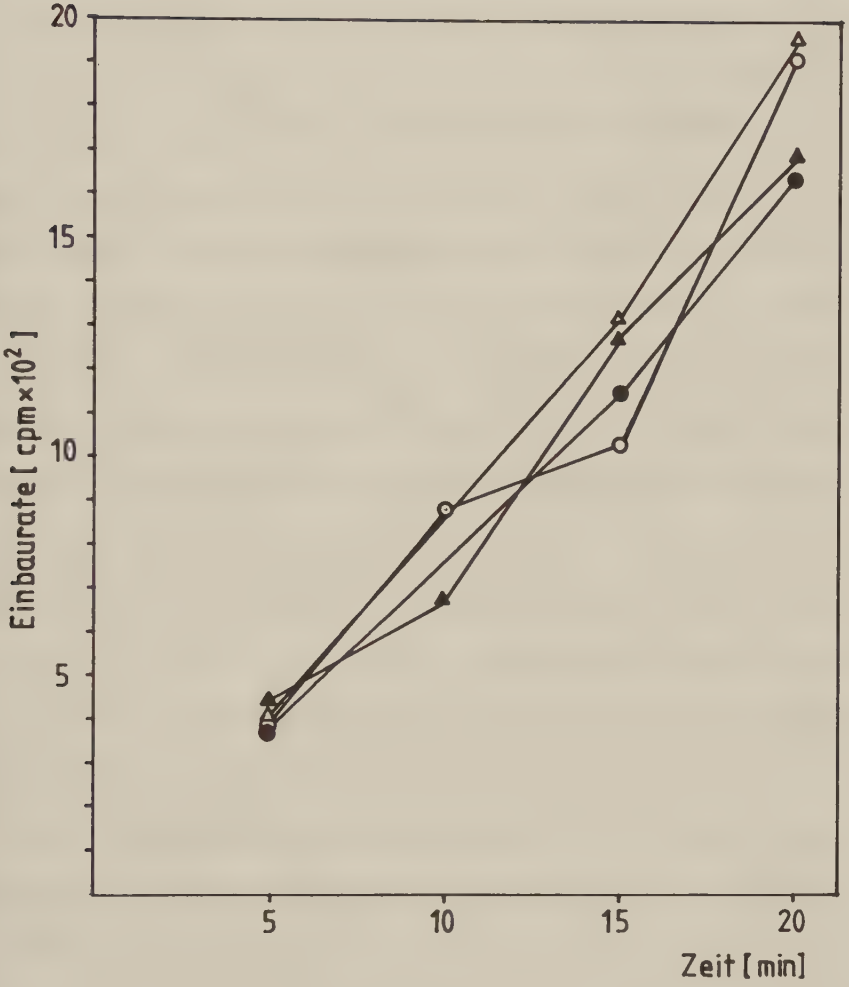

Abb. 20 : Einbau von C^{14}-markierten Vorstufen in RNA und Proteine von *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 unter dem Einfluß von 12 µM Rhizocticin (MA-Medium, 27°C).

△ Uracil ohne Antibiotikum

▲ Uracil mit Antibiotikum

○ Phenylalanin ohne Antibiotikum

● Phenylalanin mit Antibiotikum

4. Diskussion

4.1. Medienoptimierung, Fermentation und Aufarbeitung

Biologische Testmethoden erlauben keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Komponenten eines Gemisches ähnlicher Metaboliten (Fiedler, 1981). Rhizocticin I und II sowie eine weitere gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 aktive Komponente können ohne moderne HPLC-Analytik im Fermentationsverlauf nicht getrennt erfaßt werden. Zudem bereitet die Quantifizierung der antifungischen Komponenten des Rhizoctonia-Faktors Schwierigkeiten, da sich beispielsweise die Rhizocticin-Konzentration auf Grund unscharfer Hemmhofgrenzen im Plattendiffusionstest nur ungenau bestimmen läßt und Wechselwirkungen zwischen Rhizocticin und verschiedenen Antagonisten auftreten können.

Hohe Konzentrationen schnell verwertbarer Kohlenstoffquellen wie Glucose unterdrücken in vielen Fermentationen die Antibiotika-Produktion, während für das Wachstum häufig das Gegenteil gilt (Demain et al., 1979; Hostalek, 1980; Martin & Demain, 1980). In Kulturen von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 wurden mit steigenden Glucose-Konzentrationen im Bereich von 5 - 40 g/l weniger gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 aktive Metabolite gebildet. Mit Mannit als C-Quelle trat dieser Effekt in abgeschwächter Form bei Konzentrationen ab 20 g/l auf. Glucose hemmt auch die Bacitracin-Produktion in Kulturen von *Bacillus licheniformis* ATCC 10716, während das Wachstum nicht beeinträchtigt wird (Haavik, 1974). Hierbei unterliegt die Bacitracin-Produktion keiner Katabolitrepression. Der Hemmeffekt wurde auf das Absinken des pH-

Wertes zurückgeführt, denn er konnte durch Neutralisieren der Nährlösung mit $CaCO_3$ aufgehoben werden. Bei der Rhizocticin-Produktion führten hingegen niedrige Glucose-Konzentrationen zu einem Anstieg des pH-Wertes und guten Ausbeuten, während sich bei hohen Konzentrationen der pH-Wert nicht veränderte und die Produktion gering war. Hieraus kann gefolgert werden, daß im Falle des Rhizocticins eine Katabolitrepression vorliegt.

Bei niederen und mittleren Mannit-Konzentrationen (Abb.4) war die antifungische Aktivität im Kulturfiltrat etwa gleich. Auf die geringere Zellmasse bezogen ist die Ausbeute bei niedrigeren Mannit-Konzentrationen besser, sofern das Ergebnis nicht durch Antagonisten verfälscht ist.

Eine Fortführung der Medienoptimierung scheint bei verbesserter Analytik sinnvoll. Insbesondere sollte der Einfluß der Konzentrationen an Phosphat und anorganischen Ionen wie Fe^{2+} und Mn^{2+} auf die Rhizocticin-Produktion untersucht werden. Parallel hierzu sollte die Aufarbeitung von Rhizocticin durch Anwendung selektiverer Reinigungsmethoden weiter vereinfacht werden.

Ferner stellt sich die Frage, ob Rhizocticin I und II gleichzeitig gebildet werden oder ob einer dieser Metabolite eine Vorstufe der anderen Verbindung darstellt.

4.2. Vergleich von Rhizocticin mit anderen Peptidantibiotika aus Mikroorganismen

Auf den ersten Blick erscheint eine Orientierung über die Peptidantibiotika der Gattung *Bacillus* wegen der sehr großen Anzahl kaum möglich. Schränkt man die Betrachtung jedoch auf die antifungischen Metabolite der Art *Bacillus subtilis* und eng verwandter Species ein, so werden die Verhältnisse übersichtlicher. Im Wesentlichen handelt es sich um Bacilysin, Mycobacillin (Babad et al., 1952; Majumadar & Bose, 1960; Sengupta et al., 1971; Goswami & Bose, 1982), die Lipopeptide der Bacillomycin-Gruppe, von denen nach Besson und Mitarbeiter (1978) am häufigsten Bacillomycin L (Landy et al., 1947; Besson et al., 1977), Iturin A (Johnson & Burdon, 1946; Delcambe, 1950; Cercos & Castronova, 1951; Tint & Reiss, 1951; Peypoux, 1978) und Mycosubtilin (Walton & Woodruff, 1949; Peypoux et al., 1976; Peypoux et al., 1986) vorkommen, sowie um wenig charakterisierte und deshalb nicht klassifizierbare Peptidantibiotika wie B-456 (Tanaka, 1956), Alboleutin (Omura et al., 1980), BSA (J.P. 75/132188; J.P. 76/11198; Kawahara et al., 1976), Fluvomycin (Carvajal, 1952; Carvajal, 1953), Fungistatin (Lewis et al., 1946; Hobby et al., 1949; Regna et al., 1950), Botrycidin (Misato et al., 1983) und das Antibiotikum CRC Nr. 40000-5720. Als identisch mit Rhizocticin kämen nur andere hydrophile, basische Peptidantibiotika in Frage. Unter diesen nur ungenau beschriebenen Peptidantibiotika aus *Bacillus subtilis* gleicht Rhizocticin hinsichtlich des Wirkspektrums dem Antibiotikum BSA am meisten.

Weitere hydrophile, basische Antibiotika aus taxonomisch ent-

fernteren *Bacillus*-Species wie BN-1512 (J.P. 75/5597) aus *Bacillus cereus* var. *mycoides*, Breveolin (Kawamata et al., 1954) aus *Bacillus brevis* und BN-175 (Ezaki et al., 1977) aus einer nicht identifizierten *Bacillus*-Art unterscheiden sich von Rhizocticin hinsichtlich ihrer chemischen Daten und Wirkspektren.
Die Peptidantibiotika Fosfazinomycin A und B (AM-630A und AM-630B), Arginin enthaltende Phospor-Verbindungen aus *Streptomyces lavendofoliae*, ähneln Rhizocticin hinsichtlich ihrer ausgeprägten Wirkung gegen phytopathogene Pilze (Ogita et al., 1983), weichen aber in chemisch-physikalischen Daten ab.

4.3 Überlegungen zum Wirkspektrum

Rhizocticin hemmt verschiedene Pilze und den Nematoden *Caenorhabditis elegans*, zeigt aber in den geprüften Konzentrationen gegen Prokaryonten, *Paramecium caudatum* und Mäuse-B-Lymphocyten keine Wirkung.
Da Rhizocticin auch in sehr hohen Konzentrationen auf B-Lymphocyten nicht toxisch wirkte, kann vermutet werden, daß Rhizocticin eine geringe Toxizität für Säugetiere aufweist.
Für eine Erklärung der natürlichen Unempfindlichkeit von Testorganismen gegen Rhizocticin sind verschiedene Ursachen zu erwägen:

- unterschiedliche Struktur des Rhizocticin-Target-Systems
- Unterschiede in der Aufnahme des Wirkstoffes
- niedrige Toxifikation
- Detoxifikation
- Kompensation durch antagonisierende Substanzen
- alternative Stoffwechselwege.

Während verschiedene fakultativ auf Tieren parasitierende Pilze nur schwach und unvollständig durch hohe Rhizocticin-Konzentrationen gehemmt wurden, war der Großteil der phytopathogenen und auf Pflanzenresten saprobisch wachsenden Pilze deutlich sensitiver. Diese Unterschiede lassen sich vielleicht auf die Ausscheidung extrazellulärer, Rhizocticin-spaltender Proteasen oder Peptidasen zurückführen, falls die am Wirkort aktive Teilverbindung dann nicht mehr aufgenommen wird. Verschiedene Befunde wie die inaktivierende Wirkung von Pilzkolonien auf Rhizocticin (3.5.7) deuten in diese Richtung.

Das Wirkspektrum von Rhizocticin und die Angaben für den Rhizoctonia-Faktor von Michener und Snell (1949) stimmen in der fehlenden Hemmwirkung gegen Prokaryonten und der hohen Sensitivität von *Rhizoctonia solani* überein. Das Rhizocticin-Präparat ist jedoch um über zwei Zehnerpotenzen aktiver. Dies weist darauf hin, daß die von Michener und Snell untersuchten Fraktionen noch viele Verunreinigungen enthielten. Antagonisierende Substanzen würden nach den vorliegenden Ergebnissen die schwache Wirkung des Rhizoctonia-Faktors auf Sproßpilze vorgetäuscht haben.

Nur bei wenigen der vielen tausend Metaboliten, welche bis zum heutigen Tage isoliert worden sind, wurde eine Wirkung gegen Nematoden festgestellt. Die meisten dieser Antibiotika zählen zu den Aminoglykosid-Antibiotika. Hygromycin B (Goldsby & Todd, 1957; Kelly et al., 1960) und das Antibiotikum G-418 (Loebenberg et al., 1975) hemmen sowohl Nematoden als auch Cestoden. Die Destomycine (Malakhova & Fedotova, 1974; Shimura et al., 1975) sind hingegen nur gegen Nematoden aktiv. Antibiotika anderer Stoffklassen, welche gegen Nematoden wirksam sind, beinhalten das

mit Netropsin verwandte Anthelvencin (Probst et al., 1966) und die zwei Cytosin-enthaltenden Antibiotika Aspiculamycin (Haneishi et al., 1974) und Anthelmycin (Hamill & Hoehn, 1964). Aktivität gegen Nematoden weisen auch 5-Pentyl-2-furalaldehyd (L-1), 5-(4-Pentenyl)-2-furalaldehyd (L-2) und Methyl-3-*p*-anisoloxypropionat (L-3) aus *Inpex lacteus* auf (Hayashi et al., 1981). Die wohl bekanntesten Metabolite mit Wirkung gegen Insekten und Nematoden sind die Avermectine, makrocyclische Lacton-Derivate (Burg et al., 1978; Miller et al., 1979; Egerton et al., 1979; Fritz et al., 1979; Stapley & Woodruff, 1982). Verwandte der Avermectine hinsichtlich chemischer Struktur und Wirkspektrum stellen die Milbemycine dar (Takiguchi et al, 1980; Takiguchi et al., 1983; Ono et al., 1983). Rhizocticin ist das einzige Antibiotikum aus der Gattung *Bacillus* ohne ausgesprochene Breitbandwirkung, welches Nematoden hemmt. Von weiterem Interesse ist die Frage, ob Rhizocticin auch gegen weitere Invertebraten wirksam ist.

4.4. Wirkungsweise

Rhizocticin wird über das Peptidtransportsystem von *Saccharomyces cerevisiae* und von *Paecilomyces variotii* aufgenommen. Der Beweis hierfür konnte durch Kompetitionsversuche mit verschiedenen Di- und Oligopeptiden sowie durch die Bacilysin-resistente und Peptidtransport-defiziente *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante Σ1278 b.gpp$^-$, welche Kreuzresistenz zu Rhizocticin, Valclavam und Nikkomycin aufwies, geführt werden. Nach Pinnock (1975) besitzen auch freilebende Nematoden Di- und Tripeptidtransportsyteme, über welche Rhizocticin in das Innere der Zellen aufgenommen werden könnte.

Durch die basischen Dipeptide Arg-Leu-Acetat, Arg-Tyr und Lys-Glu konnte die Rhizocticin-Wirkung gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 im Vergleich zu anderen Peptiden am stärksten aufgehoben werden, während durch andere basische Dipeptide (Lys-Lys, Glu-Lys) die antifungische Wirkung nicht und durch Tyr-Lys nur schwach antagonisiert wurde (Tab. 6). Dieser Befund deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Nach den Untersuchungen von Nisbet und Payne (1979a) werden Peptide mit basischen Aminosäuren am schnellsten aufgenommen, während diejenigen mit sauren Aminosäuren schlechte Substrate darstellen. Lys-Lys wird nach ihren Befunden durch den Stamm 1278b gut transportiert. Die Lysin-auxotrophen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme Z1-2D (Marder et al., 1977), S288C-24, X_{3356}-1B und X_{3357}-1C (Becker et al., 1973) können jedoch nicht mit Lys-Lys wachsen. Die in diesem Punkt divergierenden Ergebnisse deuten auf Unterschiede in den Transportcharakteristika der einzelnen Stämme hin. Die Sequenz

der Peptide scheint für die Aufnahme durch das Peptidtransportsystem von Bedeutung zu sein, da Lys-Glu ein sehr guter Antagonist der Rhizocticin-Wirkung war, während Glu-Lys die antifungische Wirkung von Rhizocticin nicht beeinflußte. Die Bedeutung der Sequenz wurde auch von Nisbet und Payne (1979a) durch Aufnahmeuntersuchungen erkannt. Die Hemmung von *Saccaromyces cerevisiae* Tü 125 konnte durch Ala-Ala gut, durch das Tripeptid Ala-Ala-Ala schwach und das Tetrapeptid Ala-Ala-Ala-Ala nicht aufgehoben werden, was auf eine Affinität des Transportsytems für Di- und Tripeptide zurückzuführen ist. Peptide, welche Glycin am C-terminalen Ende enthielten, waren gute Antagonisten der Rhizocticinwirkung. Nach anderen Untersuchungen (Becker et al., 1973; Nisbet & Payne, 1979a) werden Peptide mit einem C- oder N-terminalen Glycinrest schlecht aufgenommen . Marder und Mitarbeiter (1977) beobachteten hingegen gutes Wachstum einer Leucin- und Lysin-auxotrophen Mutante nach Zufüttterung von Lys-Gly-Gly und Leucin. Vielleicht lassen sich auch diese widersprüchlichen Ergebnisse wiederum auf unterschiedliche Transportcharakteristika der einzelnen Hefestämme zurückführen.

Das Peptidtransportsystem von *Paecilomyces variotii* Tü 137 gleicht dem von *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125, besitzt aber eine höhere Spezifität für bestimmte Peptide (Tab. 5). Deutlich bevorzugt wurden Peptide mit der Struktur Arg-X, während durch Ala-X und Leu-X die Rhizocticin-Wirkung nicht antagonisiert werden konnte. Hierauf könnten die divergierenden Wirkspektren von Rhizocticin und Bacilysin beruhen. Bacilysin, dessen Wirkkomponente Anticapsin (2,3-Epoxycyclohexanono-4-Alanin) einen Hemmstoff der Glucosaminsynthetase darstellt (Kenig et al., 1976),

hemmt zwar die Sproßpilze *Candida albicans* Tü 565 und *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125, ist aber gegen Fadenpilze nicht oder sehr schwach wirksam (Vanittanakom, 1985). Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte man Bacilysin spalten und den Alanyl-Rest durch Arginin ersetzen. Bei Richtigkeit der Hypothese hätte die neuentstandene Arginylverbindung ein im Vergleich mit Bacilysin verändertes Wirkspektrum.

Mit L- und D-Cystin wurde ein spezifischer Hemmstoff des Peptidtransportsytemes gefunden, der für weitere Untersuchungen wertvoll sein könnte. L- und D-Cystin blockieren wahrscheinlich den Rezeptor des Peptidtransportsystems und verhindern die Aufnahme von Bacilysin, Valclavam und Rhizocticin.

Die Wirkung von Rhizocticin wurde außer durch L- und D-Cystin hauptsächlich durch L-Threonin, L-Homoserin und verschiedene Threonin-haltige Peptide aufgehoben. Da diese Verbindungen über verschiedene Transportsyteme aufgenommen werden, liegt nahe, daß Rhizocticin als Ganzes oder die durch Peptidasen abgespalten unbekannte Strukturkomponente in der einen oder anderen Weise mit dem Threoninstoffwechsel interferiert.

Verschiedene synthetisch hergestellte Substanzen und Stoffwechselprodukte aus Mikroorganismen sind als Threoninantagonisten bekannt. Plumbemycin A und B (Alanyl-aspartyl-D-2-amino-5-phosphono-3-cis-pentenylsäure und Alanyl-asparaginyl-D-2-amino-5-phosphono-3-cis-pentenylsäure), Sekundärmetabolite aus *Streptomyces plumbeus*, sind antibakteriell wirksam und können auch durch Tripeptide antagonisiert werden (Park et al., 1976; Park et al., 1977a; Park et al., 1977b; Diddens et al., 1979). L-Arginyl-D-allo-threonyl-L-phenylalanin, ein antifungisches Stoffwechselpro-

dukt aus *Keratinophyton terreum*, kann auch synthetisch hergestellt werden und wird außer durch Threonin auch durch Histidin antagonisiert (König et al.; 1973). Synthetisch hergestellte Derivate, welche D-Alanin, D-Asparagin, D-Glutamin, D-Leucin, D-Phenylalanin, D-Serin, D-Tyrosin und D-Valin anstatt D-Threonin besitzen, sind biologisch aktiv und können durch die jeweiligen L-Aminosäuren antagonisiert werden (Eisele, 1975). Die Threoninantagonisten β-Ethynylserin (Sanada et al., 1986b) und 4-Fluorothreonin (Sanada et al., 1986a) wurden aus der Kulturbrühe des Thienamycinproduzenten *Streptomyces cattleya* (Kahan et al., 1979) isoliert. Die antibakterielle Wirkung von β-Ethynylserin kann durch L-Threonin ganz und durch L-Serin oder L-Alanin teilweise aufgehoben werden. Potgieter und Mitarbeiter (1977) isolierten β-Ethynylserin aus getrockneten Sklerotien von *Sclerotium rolfsii*. Außer einer toxischen Wirkung gegen New Hampshire Küken (LD_{50} 150 mg/l) wurden von ihnen keine Angaben über die physiologischen Eigenschaften gemacht. β-Hydroxynorvalin, ein synthetisch hergestellter Threoninantagonist, ist antibakteriell aktiv (Buston et al., 1953). Von den Naturprodukten γ-Hydroxynorvalin aus *Lathyrus spec.* (Fowden, 1966) und γ-Hydroxyvalin aus *Kalanchoe daigremontiana* (Pollard et al., 1958) ist hingegen keine biologische Aktivität bekannt.

Außer durch Homoserin, Threonin, Cystin und verschiedene Peptide kann die Rhizocticin-Wirkung auch durch hohe Konzentrationen an Tryptophan, Tyrosin und Asparaginsäure aufgehoben werden (vgl. hierzu auch 3.5.10.).

Das C_4-Gerüst von Threonin und Methionin leitet sich von Homoserin ab, einem C_4-Analogen des Serins. Der Reaktionsweg für die

Reduktion der ß-Carboxylgruppe des Aspartats, der über ein Acylphosphat läuft, ähnelt der Reduktion von 1,3-Diphosphoglycerat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat durch die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase. Das in diesen beiden Reduktionsschritten gebildete Homoserin wird dann in einer ATP-verbrauchenden Reaktion zu Homoserinphosphat phosphoryliert. Homoserinphosphat wird schließlich durch die Threonin-Synthase, ein Pyridoxalphosphat-Enzym, in Threonin umgewandelt. Die Umwandlung von Homoserin in Methionin beginnt bei *Neurospora* und *Saccharomyces cerevisiae* mit der enzymatischen Bildung von O-Acetylhomoserin durch Übertragung einer Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA auf Homoserin. O-Acetylhomoserin reagiert in einer durch die Homocystein-Synthase katalysierten Kondensationsreaktion mit Sulfid zu Homocystein. Dieses Stoffwechselzwischenprodukt kann bei *Saccharomyces cerevisiae* aber auch via Cystathionin entstehen. Hierbei ersetzt Cystein das Acetat im O-Acetylhomoserin, wodurch Cystathionin entsteht. Cystathionin seinerseits wird durch die Cystathionin-ß-Lyase zu Homocystein, Pyruvat und NH_3 hydrolytisch gespalten. Im letzten Schritt der Methioninbiosynthese wird durch die Homocystein-Methyltransferase ein Methyl-Rest auf Homocystein übertragen.
Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin werden hingegen über den Shikimisäureweg gebildet. Bei der Bildung von Shikimisäure reagiert D-Erythrose-4-phosphat mit Phosphoenolpyruvat zu einer phosphorylierten C_7-Ketozuckersäure, die zu einem aus sechs C-Atomen bestehenden Ring cyclisiert wird, der 5-Dehydrochinasäure. Diese Säure wird dann in Shikimisäure umgewandelt, aus der über ein phosphoryliertes Zwischenprodukt Chorisminsäure entsteht. Von hier aus gabelt sich der Biosyntheseweg in zwei Richtungen. Die

eine Abzweigung führt zu Anthranilsäure und weiter zu Tryptophan, die andere zu der chinoiden Verbindung Prephensäure, einer Vorstufe sowohl von Phenylalanin als auch Tyrosin (Lehninger, 1975; Jones & Fink, 1980; Smith et al., 1983; Karlson, 1984).

Mit einer einfachen Enzymhemmung kann die fungizide Wirkung von Rhizocticin auf wachsende Zellen nur schwer erklärt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß eine enzymatische Reaktion in der Threoninbiosynthese gehemmt wird und toxische Vorstufen angereichert werden. Die ausgeprägte Aufhebung der Rhizocticin-Wirkung durch Threonin und Homoserin könnte auf Hemmung eines der drei ersten Enzyme in der Threoninbiosynthese (Aspartatkinase, Aspartat-semialdehyd-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase) zurückzuführen sein (Jones & Fink, 1980). Einen Widerspruch mit den bisherigen Ergebnissen zur Biosynthese von Methionin bedeutet in diesem Fall die Aufhebung der Rhizocticin-Wirkung durch Threonin. Ferner würde ein solcher Wirkort nicht die antagonistische Wirkung hoher Konzentrationen an Tryptophan, Tyrosin und Asparaginsäure erklären.

Die Rhizocticin-Wirkung könnte auch dadurch zustandekommen, daß die unbekannte Strukturkomponente des Moleküls oder ein aus ihr durch Biokonversion entstehendes Produkt an Stelle von Threonin in Proteine und Enzyme eingebaut wird und diese hierdurch ihre Funktionsfähigkeit einbüßen. Fehlfunktionen lebensnotwendiger Enzyme könnten hierbei die fungizide Wirkung des Rhizocticin erklären. Eine ähnliche Wirkungsweise liegt dem Herbizid 3-Amino-1,2,4-triazol zugrunde. 3-Amino-1,2,4-triazol wird von *Escherichia coli* in einen neuen Metaboliten (3-Amino-1,2,4-triazolylalanin), einen Antagonisten von L-Histidin, umgewandelt und in

zelleigene Proteine eingebaut (Williams et al., 1965). Weitere Beispiele von Verbindungen, welche an Stelle von biogenen Aminosäuren in Proteine eingebaut werden, sind 5 ,5 ,5 -Trifluor-D,L-leucin (Rennert & Anker, 1963; Freundlich & Trela, 1969; Trela & Freundlich, 1969), Canavanin (Richmond, 1959a; Richmond, 1959b; Schwartz & Maas, 1960; Schachtele & Rodgers, 1965), Ethionin (Levine & Tarver, 1951; Gross & Tarver, 1955), 4-Fluor-D,L-phenylalanin (Munier & Cohen, 1956; Cohen & Munier, 1959; Munier & Cohen, 1959; Wheatley & Henderson, 1973), Azetidinyl-2-carboxylsäure (Fowden, 1955; Fowden & Richmond, 1963), 2,4-Dehydro-D,L-prolin (Smith et al., 1962), 7-Azatryptophan (Pardee & Prestidge, 1958) und S-(1,2-Dichlorovinyl)-L-cystein (Dickie & Schultze, 1963a; Dickie & Schultze, 1963b).

Bei einer weit verbreiteten Methode zur Untersuchung des Einbaus antibiotisch aktiver Substanzen in Proteine werden Mutanten verwendet, welche eine Auxotrophie für die die betreffende Wirkung aufhebende Aminosäure besitzen. Dabei werden über eine gewisse Zeitspanne radioaktive Aminosäuren nur dann eingebaut, wenn die betreffende Aminosäure oder ein Antagonist, welcher an Stelle dieser Aminosäure eingebaut wird, dem Ansatz zugesetzt werden. Falls ein aus Rhizocticin hervorgeganges Stoffwechselprodukte an Stelle von Threonin in Proteine eingebaut oder die Threonyl-t-RNA-Synthetase hemmen würde, dann müßte in dem unter 3.5.14. beschriebenen Kreuztest mit einer Threonin-auxotrophen *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante als Testorganismus eine Wechselwirkung zwischen Threonin und Rhizocticin eintreten. Da die Hefemutante auch in den Randzonen des Wachstumshofes um den Threonin-haltigen Filterpapierstreifen nicht durch Rhizocticin gehemmt wurde, ist

zu vermuten, daß Rhizocticin an anderen Punkten des Stoffwechsels eingreift. Aus diesem Grunde wurde auf die oben beschriebenen Einbauversuche vorerst verzichtet.

Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus ist die Toxifikation (Biokonversion) von ursprünglich harmlosen Verbindungen durch Stoffwechselenzyme. Beispielsweise wird 6-Azauracil durch *Cladosporium cucumerinum* enzymatisch über 6-Azauridin in das fungizide Azauridin-5-phosphat überführt (Dekker, 1967). Dieser Mechanismus ist bei Fungiziden vermutlich weiter verbreitet als ursprünglich angenommen (Lyr & Bischoff, 1980). Die unbekannte Strukturkomponente des Rhizocticins könnte nach enzymatischer Spaltung des Antibiotikums durch anabolische Enzyme des Threoninstoffwechsels in die eigentlich fungizide Form gebracht werden. Bei Zugabe von exogenem Threonin würde sowohl eine Feedbackhemmung als auch eine Repression von Enzymen des Threoninstoffwechsels eintreten - die toxische Stoffwechselkomponente könnte nicht mehr gebildet werden. Auch bei diesem Versuch zur Erklärung der Rhizocticin-Wirkung kann die Aufhebung durch Tyrosin und Tryptophan nur mit großen Schwierigkeiten interpretiert werden.

Eine toxische Verbindung kann aber auch enzymatisch in ein ungiftiges Derivat umgewandelt werden. Tryptophan und Tyrosin antagonisieren in sehr hohen Konzentrationen (500 µM) die Wirkung von 1 µM Rhizocticin. Bei hohen Aminosäurekonzentrationen werden aber katabolische Enzyme des Tyrosin- und Tryptophan-Stoffwechsels wie z.B. verschiedene Mono- und Dioxygenasen induziert, welche verglichen mit anabolischen Enzymen häufig eine geringere Substratspezifität besitzen. Ähnliches gilt für die Threonin-abbauenden Enzyme. Denkbar wäre, daß eine durch Peptidasen aus Rhizocticin

freigesetzte toxische Wirkkomponente durch diese Enzyme, wenn auch mit niedriger Umsatzrate, umgewandelt und inaktiviert wird. Der tatsächliche Wirkort des Rhizocticins bleibt vorerst ungewiß, dürfte aber auf Grund der ausgeprägten Kompetition der Rhizocticin-Wirkung durch Homoserin und Threonin im Bereich des Threonin-Stoffwechsels zu suchen sein.

Eine weitere Eingrenzung der Rhizocticin-Wirkungsweise ist nur bei genauer Kenntnis der Struktur sinnvoll. Insbesondere sollte Rhizocticin mit Verbindungen des anabolischen Threonin-Stoffwechsels und des katabolischen Tryptophan- und Tyrosin-Stoffwechsels verglichen werden. Weitere Aufschlüsse über die Wirkungsweise dieses Antibiotikums sind auch von der Isolierung und Charakterisierung von Rhizocticin-resistenten *Saccharomyces cerevisiae*-Mutanten zu erwarten.

5. Zusammenfassung

Aus Kulturen des *Bacillus subtilis*-Stammes ATCC 6633 wurden das neue Antibiotikum Rhizocticin, die Hauptkomponente des von Michener und Snell (1949) beschriebenen Rhizoctonia-Faktors, und ein weiteres, *Paecilomyces variotii* Tü 137 hemmendes Antibiotikum isoliert.

Rhizocticin wurde nach Zentrifugation der Kulturbrühe bei pH 2,5 und Einengen des Überstandes durch Fällung von Verunreinigungen in 70 % Ethanol bei 4°C, Waschen mit XAD-16 sowie durch Säulenchromatographie an Sephadex G-15 und Sephadex CM-25 gereinigt.

Die Produktion von Rhizocticin und Nebenkomponenten konnte in einem chemisch definierten Medium durch zusätzliche Stickstoffquellen erhöht werden. Als bestgeeignete Kohlenstoffquelle erwies sich Mannit. Bei hohen Konzentrationen schnell verwertbarer Kohlenstoffquellen wie Glucose trat eine Katabolitrepression ein. Die optimale Produktionstemperatur lag zwischen 24°C und 28°C. Eine gute Rhizocticin-Produktion wurde in Schüttelkulturen und Umwurffermentern im 25 l und 200 l Maßstab erreicht.

Rhizocticin ist ein amorphes, farbloses, in Wasser gut lösliches Pulver. Die Substanz ist unlöslich in Ethanol, höheren Alkoholen sowie in unpolaren Lösungsmitteln. Sie ist zwischen pH 2,5 und pH 9 in wäßriger Lösung mehrere Stunden bei 95°C stabil und wird auch während zweistündiger Inkubationsdauer in 8 %-iger Perhydrollösung nicht inaktiviert.

Je nach Versuchsansatz wurde entweder Rhizocticin I oder II isoliert. Bei Rhizocticin I handelt es sich um eine stabile, ungesättigte, TDM-positive Arginin-Verbindung mit einer Molmasse von

334, welche bei saurer Hydrolyse in L-Arginin und eine ebenfalls Ninhydrin-positive Verbindung gespalten wird. Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren des Rhizocticins II unterscheiden sich von denen des Rhizocticins I durch zwei zusätzliche $-CH_2OH$ Signale.

Rhizocticin hemmt zahlreiche Pilze, darunter die phytopathogene Art *Rhizoctonia solani*. Gehemmt wird auch der Nematode *Caenorhabditis elegans*. Keine Wirkung zeigte Rhizocticin gegen Prokaryonten, den Ciliaten *Paramecium caudatum* und Lymphocyten der Maus.

Rhizocticin wirkt auf wachsende *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen fungizid. Die Wirkung von Rhizocticin läßt sich durch L- und D-Cystin, verschiedene Di- und Tripeptide, L-Threonin und L-Homoserin sowie durch höhere Konzentrationen an L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Asparaginsäure aufheben.

Die RNA- und Proteinbiosynthese wird durch Rhizocticin nicht spezifisch gehemmt.

Von *Saccharomyces cerevisiae* und *Paecilomyces variotii* wird Rhizocticin über das Transportsystem für Peptide aufgenommen. Die Aufhebung der Rhizocticin-Wirkung durch L- und D-Cystin wird auf die Hemmung des Peptidtransportsystems zurückgeführt.

Vermutlich wird Rhizocticin innerhalb der Zelle in L-Arginin und die unbekannte Strukturkomponente gespalten. Letztere dürfte auf noch nicht geklärte Art und Weise mit dem Threoninstoffwechsel interferieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BABAD, J.; A. PINSKY, R. TURNER-GRAFF & N. SHARON: An antifungal polypeptide produced by *Bacillus subtilis*. Nature 170: 618-619 (1952)

BECKER, J.M; F. NAIDER & E. KATCHALSKI: Peptide utilization in yeast. Studies on methionine and lysine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 291: 388-397 (1973)

BERDY, J.: CRC-Handbook of antibiotic compounds. CRC-Press, Boca Raton, Florida (1980)

BESSLER, W.G.; M. COX, A. LEX, B. SUHR, K.H. WIESMÜLLER & G. JUNG: Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for mureine B-lymphocytes. J. Immunologists 135: 1900-1905 (1985)

BESSLER, W.G.; R.B. JOHNSON, K.H. WIESMÜLLER & G. JUNG: B-lymphocyte mitogenicity in vitro of a synthetic lipopeptide fragment derived from bacterial lipoprotein. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363: 767-770 (1982)

BESSON, F.; F. PEYPOUX, G. MICHEL & L. DELCAMBE: Structure de la bacillomycine L, antibiotique de la *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 77: 61-67 (1977)

BESSON, F.; F. PEYPOUX, G. MICHEL & L. DELCAMBE: Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. J. Antibiot. 31: 284-288 (1975)

BETINA, V.; M. BETINOVA & M. KUTKOVA: Effects of cyanein on growth and morphology of pathogenic fungi. Arch. Mikrobiol. 55: 1-16 (1966)

BONIFAS, V.: Determination de l'association synergique binaire d'antibiotes et de sulfonamides. Experentia 8: 234-235 (1952)

BOROWSKI, E.; H. WOJCIECHOWSKA & D. WASILEWSKA: Badania budowy chemicznej antybiotyku tetainy. II. Skad aminokwasowy. Rozn. Chem. 39: 405 (1965)

BRENDEL, M.; W.W. FATH & W. LASKOWSKI: Isolation and characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* able to grow after inhibition of dTMP synthesis. Methods Cell Biol. 11: 287-302 (1975)

BRENNER, S.: The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77: 71-94 (1974)

BURG, R.W.; B.M. MILLER, E.E. BAKER, J. BIRNBAUM, S.A. CURRIE, R. HARTMAN, Y.L. KONG, R.L. MONAGHAN, G. OLSON, I. PUTTER, J.B. TUNAC, H. WALLICK, E.O. STAPLEY, R. OIWA & S. ŌMURA: Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 361-367 (1979)

BUSTON, B.W.; J. CHURCHMAN & J. BISHOP: Synthetic α-amino-β-hydroxyvaleric acids. J. Biol. Chem. 204: 665-668 (1953)

CARVAJAL, F.: Vivicil: an antibiotic effective against pathogenic bacteria and fungi. Bacteriol. Proc. p. 25 (1952)

CARVAJAL, F.: Fluvomycin: an antibiotic effective against pathogenic bacteria and fungi. Antibiotics Chemother. 3: 765-772 (1953)

CERCOS, A.P. & A. CASTRONOVA: In vitro activity of fungocin. An. Socient, Argentina 152: 68 (1951). Chem. Abstr. 46: 1432 (1952)

CHMARA, H. & E. BOROWSKI: Antibiotic tetaine, a new inhibitor of murein precursors synthesis in *Escherichia coli* K-12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52: 1382-1387 (1973)

COHEN, G.N. & R. MUNIER: Effects des analogues structuraux d'aminoacides sur la croissance la synthèse de protéines et la synthèse d'enzymes chez *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 31: 347-356 (1959)

CYBULLA, J.; H. BRÜCKNER, G. JUNG, T. WIPPERFÜRTH & W.G. BESSLER: The mithogenic principle of *Escherichia coli* lipoprotein. B-lymphocyte mitogenicity of N-palmitoyl-cysteine and N-palmitoyl glutamic α-acid methyl esters. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 1389-1396 (1980)

DAHN, U.; H. HAGENMAIER, H. HÖHNE, W.A. KÖNIG, G. WOLF & H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikrorganismen. 154. Mitteilung. Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthase bei Pilzen. Arch. Microbiol. 197: 143-160 (1976)

DEKKER, J.: Conversion of 6-azauracil in sensitive and resistant strains of *Cladosporium cucumerinum*. In: Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotika, M. Girbardt (ed.), pp. 333-339, Akademie-Verlag, Berlin (1967)

DELCAMBE, L.: L'iturine, nouvel antibiotique produit par *Bacillus subtilis*. C. R. Soc. Biol, 144: 1431-1434 (1950)

DEMAIN, A.L.; Y.M. KENNEL & Y. AHARONOWITZ: Carbon catabolite regulation of secondary metabolism. In: Microbial technology: current state, future prospects, Bull, A.T., D.C. Ellwood and C. Ratledge (eds.), pp. 163-185, Cambridge University Press, London (1979)

DICKIE, N. & M.O. SCHULTZE: Inhibition of *Escherichia coli* by S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine: effects on growth and amino acid uptake. Arch. Biochem. Biophys. 100: 279-284 (1963a)

DICKIE, N. & M.O. SCHULTZE: Effects of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine on amino acid composition of proteins of *Escherichia coli* B. Arch. Biochem. Biophys. 100: 285-288 (1963b)

DIDDENS, H.; M. DORGERLOH & H. ZÄHNER: Metabolic products of microorganisms. 176. On the transport of small peptide antibiotics in bacteria. J. Antibiot. 32: 87-90 (1979)

EBATA, M.; K. MIYAZAKI & T. TAKAHASHI: Studies on subsporin. I. Isolation and characterization of subsporins A, B and C. J. Antibiot. 22: 467-472 (1969)

EGERTON, J.R.; D.A. OSTLIND, L.S. BLAIR, C.H. EARY, D. SUHAYDAY, S. CIFELLI, R.F. RIEK & W.C. CAMPBELL: Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of B_{1a} component. Antimicr. Agents Chemother. 15: 372-378 (1979)

EISELE, K.: Antibiotisch wirksame Tripeptide der Sequenz L-Arg-D-X-L-Phe. Experientia 31: 764-765 (1975)

EZAKI, N.; S. AMANO, S. MIYADO, C. NOJIRI, K. KATSUMATA, K. FUKUSHIMA, T. TSURUOKA, Y. YAMADA & T. NIIDA (Meiji Confectionary Ltd.): Antibiotic BN-175. Chem. Abstr. 87: 206111 (1977)

FIEDLER, H.P.: Quantitation of nikkomycins in biological fluids by ionpair reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 204: 313-318 (1981)

FORSTER, J.W. & H.B. WOODRUFF: Bacillin, a new antibiotic substance from a soil isolate of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 51: 363-369 (1946)

FOWDEN, L.: Azetidine-2-carboxylic acid: a new constituent of plants. Nature 176: 347-348 (1955)

FOWDEN, L.: Isolation of γ-hydroxynorvaline from *Lathyrus odoratus* seed. Nature 209: 807-808 (1966)

FOWDEN, L. & M.H. RICHMOND: Replacement of proline by azetidine-2-carboxylic acid during biosynthesis of protein. Biochim. Biophys. Acta 71: 459-461 (1963)

FREUNDLICH, M. & J.M. TRELA: Control of isoleucine, valine and leucine biosynthesis. VI. Effect of 5',5',5'-trifluor-DL-leucine. J. Bacteriol. 99: 101-106 (1969)

FRITZ, L.C.; C.C. WANG & A. GORIO: Avermectin B_{1a} irreversably blocks postsynaptic potentials at the neuromuscular junction by reducing muscle membrane resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2062-2066 (1979)

GOLDSBY, A.I. & A.C. TODD: A new swine anthelmintic. North. Am. Vet. 38: 140-144 (1957)

GOSWAMI, S.K. & S.K. BOSE: Isolation of mycobacillin from the culture filtrate of a mutant derivate of *Bacillus subtilis*. Indian J. Biochem. Biophys. 19: 57 (1982)

GRENSON, M.: The utilization of exogenous pyrimidines and the recycling of uridine-5'-phosphate derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, as studied by means of mutants affected in pyrimidine uptake and metabolism. Eur. J. Biochem. 11: 249-260 (1966)

GRIVELL, A.R. & J.F. JOHNSON: Thymidine kinase: evidence for its absence from *Neurospora crassa* and some other microorganisms and the relevance of this to the specific labeling of deoxyribonucleic acid. J. Gen. Microbiol. 54: 307-317 (1968)

GROSS, D. & H. TARVER: Studies on ethionine: VI. incorporation of ethionine into proteins of *Tetrahymena*. J. Biol. Chem. 217: 169-182 (1955)

HAAVIK, H.J.: Studies on the formation of bacitracin in *Bacillus licheniformis*. J. Gen. Microbiol. 81: 383-390 (1974)

HAMILL, R.L. & M.M. HOEHN: Anthelmycin, a new antibiotic with anthelmintic properties. J. Antibiot. 17: 100-103 (1964)

HANEISHI, T.; M. ARAI, N. KITANO & S. YAMAMOTO: Aspiculamycin, a new cytosine nucleoside antibiotic. III. Biological activities, in vitro and in vivo. J. Antibiot. 27: 339-342 (1974)

HAYASHI, M.; K. WALDE & K. MUNAKATA: New nematicidal metabolites from a fungus, *Irpex lacteus*. Agric. Biol. Chem. 45: 1527-1529 (1981)

HOBBY, G.L.; P.P. REGNA, N.DOUGHERTY & W.E. STEIG: The antifungal activity of antibiotic XG. J. Clin. Invest. 28: 927 (1949)

HÖHNE, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese. Dissertation Universität Tübingen (1974)

HOSTALEK, Z.: Catabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Folia Microbiol. 25: 445-450 (1980)

HÜTTER, R.; W. KELLER-SCHIERLEIN, J.NÜSCH & H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung. Scopamycine. Arch. Microbiol. 51, 1-8 (1965)

HÜTTER, R.; K. PORALLA, H.G. ZACHAU & H.ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 51. Mitteilung. Über die Wirkungsweise von Borrelidin - Hemmung des Threonineinbaus in sRNA. Biochem. Z. 344: 190-196 (1966)

JAPANESE PATENT, siehe J. Berdy, 1980

JOHNSON, E.A. & K.L. BURDON: Eumycin, a new antibiotic active against pathogenic fungi and higher bacteria, including bacilli of tuberculosis and diphteriae. J. Bacteriol. 51: 591 (1946)

JOHNSON, R.B.; S. KOHL, K.H. WIESMÜLLER, G. JUNG & W.G. BESSLER: Synthetic analogues of the N-terminal lipid part of bacterial lipoprotein are lymphocyte-B mitogens in vitro and vivo. Immunbiology 165: 27-36 (1983)

JONES, E.W. & G.R. FINK: Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast, pp. 181-299. In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, metabolism and gene expression, J.M. Strathern, E.W. Jones, J.B. Broach (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory (1982)

KAHAN; J.S., F.M. KAHAN, R. GOEGELMAN, S.A. CURRIE, M. JACKSON, E.O. STAPLEY, T.W. MILLER, A.K. MILLER, D. HENDLIN, S. MOCHALES, S. HERNANDEZ, H.B. WOODRUFF & J. BIRNBAUM: Thienamycin, a new β-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. J. Antibiot. 32: 1-12 (1979)

KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 12. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1984)

KAWAHARA, R.; A. SAOKA, J. SATO, K. IMAMORI, S. SATO, H. OHNO, Y. ODAKA, Y. ARA & S. MIYAMOTO (S.S. Pharmaceutical Co., Ltd.): BSA. Chem. Abstr. 84: 162881 (1971)

KAWAMATA, J. & Y. MOTOMURA: Breveolin, an antibiotic produced by a strain of *Bacillus brevis*. J. Antibiot. 7: 25 (1954)

KELLER-SCHIERLEIN, W.: Stoffwechselprodukte von Mikrorganismen. 55. Mitteilung. Über die Konstitution des Borrelidins. Helv. Chim. Acta 50: 731-753 (1967)

KELLY, S.W.; L. HARRIS, M.A. ALEXANDER & L.S. OLSEN: Hygromycin B for removing *Thysanosoma actinioides*, fringed tapeworms from feedlot lambs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 136: 505-507 (1960)

KENIG, M.; E. VANDAMME & E.P. ABRAHAM: The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants. J. Gen. Microbiol. 94: 46-54 (1976)

KÖNIG, W.A.; W. LOEFFLER, W.H. MEYER & R. UHMANN: L-Arginyl-D-allo-threonyl-L-phenylalanin, ein Aminosäure-Antagonist aus dem Pilz *Keratinophyton terreum*. Chem. Ber. 106: 816-819 (1973)

KUGLER, M.: Antifungische Metabolite in der Gattung *Bacillus*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Tübingen (1984)

LANDY, M.; S.B. ROSENMAN & G. WARREN: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. J. Bacteriol. 54: 24 (1947)

LEHNINGER, A.L.: Biochemistry. 2 nd. Worth. Publishers, Inc., New York (1975)

LEVINE, M. & H. TARVER: Studies on ethionine. III. Incorporation of ethionine into rat proteins. J. Biol. Chem. 192: 835-850 (1951)

LEWIS, G.M.; M.E. HOPPER & S. SCHULTZ: In vitro fungistatis by bacterium (*Bacillus subtilis* var. X6, X4). Arch. Dermatol. Syphilol. 54: 300-306 (1946)

LOEBENBERG, D.; M. COUNELIS & J.A. WAITZ: Antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside active against protozoa and helminths: antiparasitic acitivity. Antimicr. Agents Chemother. 7: 811-815 (1975)

LOEFFLER, W.; J.S.-M. TSCHEN, N. VANITTANAKOM, M. KUGLER, E. KNORPP, T.-F. HSIEH & T.G. WU: Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. J. Phytopathol. 115: 204-213 (1986)

LYR, H. & G. BISCHOFF: Zum Problem der Resistenzbildung von Pilzen gegenüber modernen Fungiziden. Biolog. Rundschau 18: 365-372 (1980)

MAJUMDAR, S.K. & S.K. BOSE: Aminoacid sequence in mycobacillin. Biochem. J. 74: 566-599 (1960)

MALAKHOVA, E.I. & M.N. FEDOTOVA: Effectiveness of destonate-20 against nematodes in pigs and birds. Byull. Vses. Inst. Gelmintol. 12: 43-45 (1974)

MARDER, R.; J.M. BECKER & F. NAIDER: Peptide transport in yeast: utilization of leucine- and lysine-containing peptides by *Saccaromyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 131: 906-916 (1977)

MARDER, R.; B. ROSE, J.M. BECKER & F. NAIDER: Isolation of a peptide transport-deficient mutant of yeast. J. Bacteriol. 136: 1174-1177 (1978)

MARTIN, J.F. & A.L. DEMAIN: The control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. 44: 230-251 (1980)

MC CARTHY, P.J.; P.F. TROKE & K. GULL: Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 131: 775-780 (1985)

MICHENER, H.D. & N. SNELL: Two antifungal substances from *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. 22: 208-214 (1949)

MILLER, T.W.; L. CHAIET, D.J. COLE, L.J. COLE, J.E. FLOR, R.T. GOEGELMAN, V.P. GULLO, H. JOSHUA, A.J. KEMPF, W.R. KRELLWITZ, R.L. MONAGHAN, R.E. ORMONDO, K.E. WILSON, G. ALBERSSCHÖNBERG & I. PUTTER: Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 368-371 (1979)

MISATO, T. et al.: Botrycidin A. J. Antibiot. 83: 71 (1983)

MITCHISON, J.M.: Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. In: Methods in cell Physiology, Vol. 4, pp. 131-177, D.M. Prescott (ed.), Academic Press, New York & London (1970)

MOORE, G.E.; R.E. GERNER & H.A. FRANKLIN: Culture of normal human leucocytes. J. Am. Med. Assoc. 199: 87-92 (1967)

MUNIER, R. & N. COHEN: Incorporation d'analogues structuraux d'aminoacides dans les protéines bacteriénnes. Biochim. Biophys. Acta 21: 592-593 (1956)

MUNIER, R. & N. COHEN: Substitution totale de la phénylalanine par l'*o* - ou la *m*-fluorophénylalanine dans les protéines bacteriennes. Biochim. Biophys. Acta 21: 592-593 (1959)

NAIDER, F.; J.M. BECKER & E. KATZIR-KATCHALSKI: Utilization of methionine-containing peptides and their derivatives by a methionine-requiring auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 249: 9-20 (1974)

NASS, G. & K. PORALLA: Genetics of borrelidin resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and properties of their threonyl-tRNA-synthetase. Molec. Gen. Genet. 147: 39-43 (1976)

NEWTON, G.F.F.: Antibiotics from a strain of *Bacillus subtilis*: bacilipins A and B and bacilysin. Brit. J. Exptl. Pathol. 30: 306-319 (1949)

NISBET, T.M. & J.W. PAYNE: Specificity of peptide uptake in *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of a bacilysin-resistant peptide transport deficient mutant. FEMS letters 7: 193-196 (1979a)

NISBET, T.M & J.W. PAYNE: Peptide uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Characteristics of a transport system shared by dipeptides and oligopeptides. J. Gen. Microbiol. 115: 127-133 (1979b)

OGITA, T.; S. GUNJI, Y. FUKAZAWA, A. TERAHARA, T. KINOSHITA, H. NAGAKI & T. BEPPU: The structures of fosfazinomycins A and B. Tetrahedron Lett. 24: 2283-2286 (1983)

ŌMURA, S.; I. YUZURU & R. MASUMA: A new antibiotic, alboleutin. J. Antibiot. 33: 758-759 (1980)

ONO, M.; H. MISHIMA, Y. TAKIGUCHI & M. TERAO: Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics. Fermentation, isolation, physicochemical properties and bioconversion of milbemycins J and K. J. Antibiot. 36: 509-515 (1983)

PARDEE, A.B. & L.S. PRESTIDGE: Effects of azatryptophan on bacterial enzymes and bacteriophages. Biochim. Biophys. Acta 27: 330-334 (1958)

PARK, B.K.; A. HIROTA & H.SAKAI: 2-Amino-5-phosphono-3-pentenoic acid, a new amino acid from N-1409 substance, an antagonist of threonine. Agr. Biol. Chem. 40: 1905-1906 (1976)

PARK, B.K.; A. HIROTA & H.SAKAI: Studies on new antimetabolite N-1409. Agr. Biol. Chem. 41: 161-167 (1977a)

PARK, B.K.; A. HIROTA & H.SAKAI: Structure of plumbemycin A and B, antagonists of L-threonine from *Streptomyces plumbeus*. Agr. Biol. Chem. 41: 573-579 (1977b)

PARKER, D.D.; F. NAIDER & J.M. BECKER: Separation of peptide transport and hydrolysis in trimethionine uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 141: 1066-1069 (1980)

PETER, H.; J. RABENHORST, F. RÖHL & H. ZÄHNER: Valclavam: an antifungal β-lactam antibiotic. In: Recent advances in Chemotherapy, antimicrobial section, pp. 237-238, Proceedings of 14th international congress of chemotherapy, J. Ishigami (ed.), Kyoto, 1985

PEYPOUX, F.; M. GUINAND, G. MICHEL, L. DELCAMBE, B.C. DAS & E. LEDERER: Structure of iturin A, a peptolid antibiotic from *Bacillus subtilis*: Biochemistry 17: 3992-3996 (1978)

PEYPOUX, F., G. MICHEL & L. DELCAMBE: Structure de la mycosubtiline, antibiotique isolé de *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 63: 391-399 (1976)

PEYPOUX, F.; M.T. POMMIER, D. MARION, M. PTAK, B.C. DAS & G. MICHEL: Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. J. Antibiot. 39: 636-641 (1986)

PINNOCK, C.; B. SHANE & E.L.R. STOKSTAD: Stimulatory effects of peptids on growth of the free-living nematode *Caenorhabditis briggsae* (B 8615). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148: 710-713 (1975)

POLLARD, J.K.; E. SONDHEIMER & F.C. STEWARD: Hydroxyvaline in *Kalanchoe daigremontiana*. Nature 182: 1356-1358 (1958)

PORALLA, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolidantibiotika. Dissertation, Universität Tübingen (1967)

PORALLA, K. & H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 62. Mitteilung. Die Hemmung des Einbaus von Threonin in sRNS im zellfreien System und der Synthese von Protein und Nukleinsäuren in der Zelle durch das Antibiotikum Borrelidin. Arch. Mikrobiol. 61: 143-153 (1968)

POTGIETER, H.C.; N.M.J. VERMEULEN, D.J.J. POTGIETER & H.F. STRAUSS: A toxic amino acid, 2(S),3(R)-2-Amino-3-hydroxypent-4-ynoic acid from the fungus *Sclerotium rolfsii*. Phytochem. 16: 1757-1759 (1977)

PROBST, G.W.; M.W. HOEHN & B.L. WOODS: Anthelvencins, new antibiotics with anthelmintic properties. Antimicrob. Agents Chemother. pp. 789-795 (1966)

RABENHORST, J.; F. RÖHL & H. ZÄHNER: Valclavam - ein antifungisches β-Lactam. Gemeinsame Frühjahrstagung der VAAM und der Sektion I der DGHM, Münster (1986)

REGNA, P.P.; R.A. CARBON & W.E. STEIG. Am. Chem. Soc. Meet. in Minature, New York (1950)

RENNERT; O.M. & H.S: ANKER: On the incorporation of 5',5',5'-trifluoroleucine into proteins of *Escherichia coli*. Biochem. 2: 247-276 (1963)

REUSCHENBACH, P.: Studien zur Fermentation der phosphorsäuretriesterhaltigen Lactone aus Tü 1718. Dissertation, Universität Tübingen (1986)

RICHMOND, M.H.: The differential effect of arginine and canavanine on growth and enzyme formation in *Staphylococcus aureus* 524SC. Biochem. J. 73: 155-167 (1959a)

RICHMOND, M.H.: Incorporation of canavanine by *Staphylococcus aureus* 524SC. Biochem. J. 73: 261-264 (1959b)

ROBICHON-SZULMAJSTER, H. DE; SURDIN, Y. & R.K. MORTIMER: Genetics and biochemical studies of genes in *Saccharomyces* controlling the synthesis of threonine and methionine. Genetics 53: 609-619 (1966)

SANADA, M.; T. MIYANO, S. IWADARE, J.M. WILLIAMSON, B.H. ARISON, J.L. SMITH, A.W. DOUGLAS, J.M. LIESCH & E. INAMINE: Biosynthesis of fluorothreonine and fluoroacetic acid by the thienamycin producer, *Streptomyces cattleya*. J. Antibiot. 39: 259-265 (1986)

SANADA, M.; T. MIYANO & S. IWADARE: β-Ethynylserin, an antimetabolite of L-threonine from *Streptomyces cattleya*. J. Antibiot. 39: 304-305 (1986)

SCHACHTELE, C. & P. RODGERS: Canavanine-death in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 14: 474-489 (1965)

SCHINDLER, D & J. DAVIES: Inhibitors of macromolecular synthesis in yeast. Methods Cell Biol. 12: 17-38 (1975)

SCHWARTZ, J. & W.K. MAAS: Analysis of the inhibition of growth produced by canavanine in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 79: 794-799 (1960)

SEIBOLD, M.; K. NILL & K. PORALLA: Homoserine and threonine pools of borrelidin resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutants with an altered aspartokinase. Arch. Microbiol. 129: 368-370 (1981)

SENGUPTA, S.; A.B. BANERJEE & S.K. BOSE: γ-Glutamyl and D- or L-peptide linkages in mycobacillin, a cyclic peptide antibiotic. J. Biochem. 121: 839-846 (1971)

SHIMURA, M.; Y. SEKIZAWA, K. IINUMA, H. NAGAHAWA & S. KONDO: Destomycin C, a new member of destomycin family antibiotics. J. Antibiot. 28: 83-84 (1975)

SMITH, L.C.; J.M. RAVEL, C.G. SKINNER & W.SNIRE: 3,4-Dehydroproline, a proline antagonist. Arch. Biochem. Biophys. 99: 60-64 (1962)

SMITH, E.L.; R.L. HILL, I.R. LEHMAN, R.J. LEFKOWITZ, P. HANDLER & A. WHITE: Principles of biochemistry: general aspects. Seventh Edition, Mc Graw-Hill Book Company, Singapore (1983)

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)

STAPLEY, E.O. & H.B. WOODRUFF: Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolated from a soil in Japan. Trends in Antibiotic Research, pp. 154-170, Jap. Antibiotic Soc., 1982

TAKIGUCHI, Y.; H. MISHIMA, M. OKUDA, M. TERAO, A. AOKI & R. FUKUDA: Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. J. Antibiot. 33: 1120-1127 (1980)

TAKIGUCHI, Y.; M. ONO, S. MURAMATSU, J. IDE, H. MISHIMA & M. TERAO: Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties of milbemycins D, E, F, G and H. J. Antibiot. 36: 502-508 (1983)

TANAKA, Y.: Studies on an antifungal antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. J. Antibiot. 9: 1-8 (1956)

TINT, H. & W. REISS: Some properties of bacillomycin B-cytochrome complex. J. Biol. Chem. 190: 133-148 (1951)

TRELA J.M. & M. FREUNDLICH: Uncoupling of protein and ribonucleic acid synthesis by 5',5',5'-trifluoroleucine in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 99: 107-112 (1969)

VANITTANAKOM, N.: Antifungal antibiotics of *Bacillus subtilis* F-29-3: studies on bacilysin and fengymycin, a newly described lipopeptide. Dissertation, Universität Tübingen (1985)

VANITTANAKOM, N.; W. LOEFFLER, U. KOCH & G. JUNG: Fengycin - a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Antibiot. 39: 888-901 (1986)

WALKER, J.E. & E.P. ABRAHAM: The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*. Biochem. J.: 118: 563-565 (1970)

WALTON, R.B. & H.B. WOODRUFF: A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. J. Clin. Invest. 28: 924-926 (1949)

WHEATLEY, D. & J.Y. HENDERSON: *p*-Fluorophenylalanine and division related proteins. Nature 247: 281-283 (1974)

WICKNER, R.B.: Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that incorporate deoxythymidine-5'-monophosphate into deoxyribonucleic acid in vivo. Methods Cell Biol. 11: 295-302 (1975)

WILLIAMS, A.K.; S.T. COX & R.G. EAGON: Conversion of 3-amino-1,2, 4-triazole into 3-amino-1,2,4-triazolyl alanine and its incorporation into protein by *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18: 250-254 (1965)

ZÄHNER, H. & W.K. MAAS: Biology of antibiotics. Springer, New York. 125 pp. (1972)

7. Anhang

7.1. Chemische Struktur von Rhizocticin I

Auf Grund der ähnlichen Wirkungsweise von Rhizocticin und Plumbemycin A und B wurden die chemischen Daten von Rhizocticin I, II und III mit denen von D-2-Amino-5-phosphono-3-cis-pentensäure (APPA), der Wirkkomponente von Plumbemycin, verglichen. In Tabelle 8 und 9 sind sowohl die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten von Rhizocticin I als auch Literaturwerte von Arginin und APPA (Park et al., 1977b) aufgeführt.

Tabelle 8: ^{1}H-NMR-Daten von Rhizocticin I (δ(ppm);D_2O)

gemessene Werte	Literaturwerte	Zuordnung
4.05	4.13	Arg α-H
2.00	2.02	Arg β-H (2H)
1.80	1.88	Arg γ-H
3.29	3.27	Arg δ-H
4.93 (1H;d;J=8.9Hz)	4.81	APPA α-H
5.71 (1H;m)	5.64	APPA β-H
5.88 (1H;m)	6.12	APPA γ-H
2.62 (2H;m;J=9.3Hz)	2.72	APPA δ-H

Tabelle 9: ^{13}C-NMR-Daten von Rhizocticin I (δ(ppm);D_2O)

gemessene Werte	Literaturwerte	Zuordnung*
179.8	175.2	Arg (C=O)
55.3	55.1	Arg (CH)
30.4	28.5	Arg (CH_2)C-3
25.8	24.9	Arg (CH_2)C-4
42.9	41.5	Arg (CH_2)C-5
159.3	157.5	Arg (C=NH)
171.1	172.7	APPA (C=O)
55.7 (s)	51.5	APPA (CH)
128.6 (d;J=13Hz)	123.5	APPA (CH)
131.4 (d;J=10Hz)	132.9	APPA (CH)
31.6 (d;J=128Hz)	29.3	APPA (CH_2)

* aus Spin-Echo-Experiment

Das FD-Massenspektrum weist auf Grund des $(M+H)^+$-Peaks bei 196 auf das Vorliegen von APPA (Abb. 10) hin.
Die nichtproteinogene Aminosäure (APPA) des Dipeptidantibiotikums Rhizocticin I wurde nach Hydrolyse mittels semipräparativer HPLC isoliert (Abb. 9). In Tabelle 10 und 11 sind die durch NMR-spektroskopische Untersuchungen verursachten Verschiebungen dieser seltenen Aminosäure im ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektrum aufgeführt.

Tabelle 10: ^{1}H-NMR-Daten von APPA (δ(ppm);D_2O;400.13Hz)

gemessene Werte	Literaturwerte	chemische Verschiebung
2.68 (2H;m;m;J=7.5Hz)	2.72 (2H;d;d;J=8.4Hz)	δCH
4.59 (1H;d;J=9.8Hz)	4.81 (1H;d;J=9.5Hz)	αCH
5.63 (1H;m)	5.64 (1H;d/t;J=5.2,9.5Hz)	βCH
6.04 (1H;m)	6.12 (1H;m)	γCH

Tabelle 11: ^{13}C-NMR-Daten von APPA (δ(ppm; D_2O;100.6MHz)

gemessene Werte	Literaturwerte	Zuordnung
176.19 (s)	172.7 (s)	C-1
54.03 (s)	51.5 (s)	C-2
126.48 (d;J=13Hz)	123.5 (d;J=12Hz)	C-3
134.15 (d;J=10Hz)	132.9 (d;J=11Hz)	C-4
31.23 (d;J=127Hz)	29.3 (d;J=127Hz)	C-5

Alle Befunde bestätigen die Annahme, daß es sich bei der unbekannten Komponente um D-2-Amino-5-phosphono-3-cis-pentensäure (APPA) handelt (Abb. 21).

Rhizocticin I zeigt eine starke Endabsorption im Bereich von 200 nm (Abb. 22).

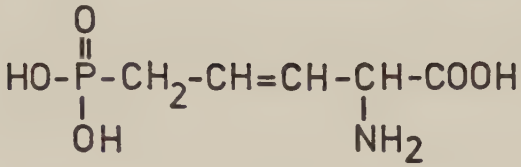

Abb. 21: D-2-Amino-5-phosphono-3-cis-pentensäure (APPA).

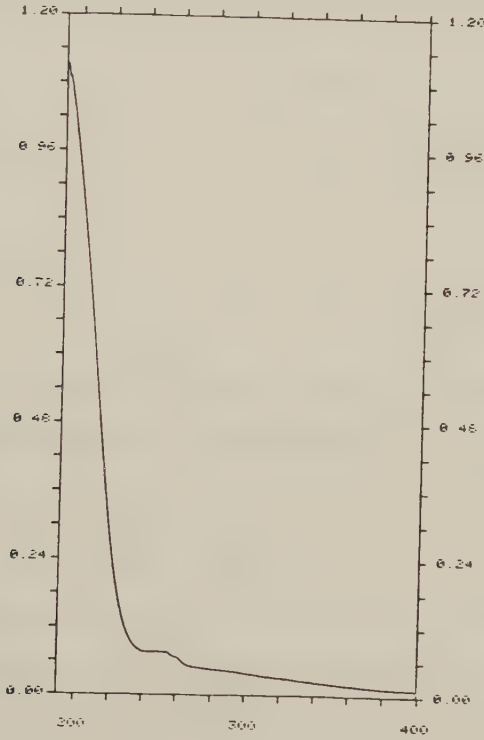

Abb. 22: UV-Spektrum von Rhizocticin I

Die fehlende Anfärbbarkeit mit Ninhydrin, die um 18 Masseneinheiten gegenüber dem Dipeptid zu niedrige Molmasse und das Fragmentierungsverhalten im FD-Massenspektrum weisen auf eine cyclische Struktur von Rhizocticin I hin. Hieraus kann eine vorläufige Struktur von Rhizocticin I aufgestellt werden (Abb. 23).

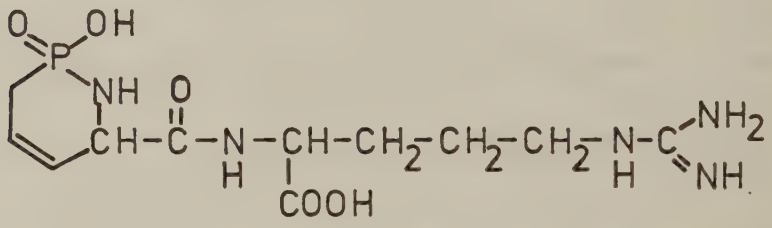

Abb. 23: Struktur von Rhizocticin I

7.2. Rhizocticin II

Rhizocticin II verhält sich stärker polar als Rhizocticin I. Im HPLC-Chromatogramm an Nucleosil-NH_2 zeigt diese Komponente eine deutlich längere Retentionszeit (t_R=5,8 Minuten).
Im FD-Massenspektrum findet sich als Hauptpeak 350 u (100 rel. %). Wie Rhizocticin I ist Rhizocticin II nicht mit Ninhydrin, dagegen aber mit TDM anfärbbar. Auch die ^1H- und ^{13}C-NMR-Spektren (Tabelle 12 und 13) von Rhizocticin II stimmen weitgehend mit den Daten von Rhizocticin I überein. Abweichend finden sich zwei zusätzliche ^{13}C-Resonanzen im Bereich hydroxylierter C-Atome (vgl. hierzu 3.4.9.). Das ^1H-NMR-Spektrum von Rhizocticin II

weist eine zusätzliche alkoholische Methylen- und eine weitere Methingruppe auf. Diese Signale verschwinden vollständig bei saurer Hydrolyse. Im Hydrolysat findet sich ausschließlich L-Arginin und APPA. Der noch fehlende Bestandteil wurde als 1,2-Dihydroxyethyl-Rest identifiziert. Die noch fragliche Stellung dieser Gruppe konnte durch das Fragmentierungsmuster im FD-Massenspektrum ermittelt werden. Die gefundene Fragmentierung stimmt mit der Struktur in Abb. 24 überein.

Tabelle 12: ^{1}H-NMR-Daten von Rhizocticin II (400.13MHz;D_2O)

gemessene Werte	Literaturwerte	Zuordnung
4.0	4.13	Arg α-H
2.0 (m;2H)	2.02	Arg β-H
1.8 (m;2H)	1.88	Arg γ-H
3.3	3.27	Arg δ-H
4.8 (1H;d;J=8.9Hz)	4.81	APPA α-H
5.7 (1H;m)	5.64	APPA β-H
5.9 (1H;m)	6.12	APPA γ-H
2.6 (2H;m;J=9Hz)	2.72	APPA δ-H
3.6 (2H;m;J=5Hz)	-	
3.8 (1H;m)	-	

Tabelle 13: ^{13}C-NMR-Daten von Rhizocticin II (100.6MHz;D_2O)

gemessene Werte	Literaturwerte	Zuordnung
179.8	175.2	Arg C-1
55.4	55.1	Arg C-2
30.6	28.5	Arg C-3
25.0	24.9	Arg C-4
43.0	41.5	Arg C-5
159.4	157.5	Arg C-6
171.4	172.7	APPA C-1
55.8 (s)	51.5	APPA C-2
128.7 (d;J=13Hz)	123.5	APPA C-3
131.5 (d;J=10Hz)	132.9	APPA C-4
31.7 (d;J=127Hz)	29.3	APPA C-5
65.1 (s)	-	
74.7 (s)	-	

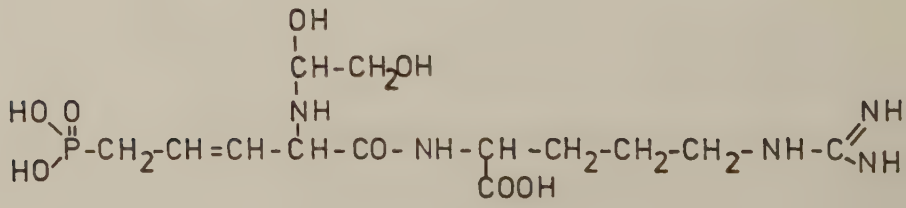

Abb. 24: Struktur von Rhizocticin II

7.3. Chemische Untersuchungen zu Rhizocticin III

Bei der unter 2.7. beschriebenen Aufarbeitung von Rhizocticin I und II konnte noch ein weiterer gegen *Paecilomyces variotii* Tü 137 aktiver Wirkstoff, von unseren Arbeitsgruppen Rhizocticin III genannt, isoliert werden.

Der R_f-Wert dieser Verbindung betrug in Chloroform/Methanol/15 % Ammoniak (2/2/1) 0,50, in n-Butanol/Wasser/Essigsäure (2/2/1) 0,15. Die Farbreaktion von Rhizocticin III fällt mit Ninhydrin und Chlor-TDM positiv aus, was auf eine freie Aminogruppe hinweist. Eine gaschromatographische Bestimmung der N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester eines Totalhydrolystes an Chirasil-Val ergab die Aminosäuren L-Arginin und L-Valin. Durch Aminosäurenanalyse konnte zusätzlich wieder die bereits beschriebene saure Aminosäure detektiert werden.

Das Tripeptid besitzt die Molmasse 450 (Abb. 25, FD-Massenspektrum) und enthält wie Rhizocticin II eine $HO_3P\text{-}CH_2$-Gruppe (Abb. 26, ^{31}P-Kernresonanzspektrum, BB-entkoppelt; Abb. 27, ^{31}P-Kernresonanz-spektrum, ^{1}H-gekoppelt). Charakteristische ^{31}P-Kopplungen im ^{13}C-Kernresonanzspektrum (Abb. 28) und ^{13}C-NMR-DEPT-Spektrum (Abb. 29) führten in Korrelation mit dem ^{1}H-Kernresonanzspektrum (Abb. 30) zu der Identifikation der P-haltigen Aminosäure als APPA. Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen von Rhizocticin III sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Durch Trypsin erfolgte keine Spaltung des Tripeptids. Die Dansylierung des Tripeptids liefert als N-terminale Aminosäure L-Valin. Auf Grund dieser Befunde sowie des Fragmentierungsmusters im FD-Massenspektrum und NMR-spektroskopischen Verschiebungen

kann geschlossen werden, daß ein Tripeptid mit der Sequenzfolge L-Val-D-APPA-L-Arg vorliegt.

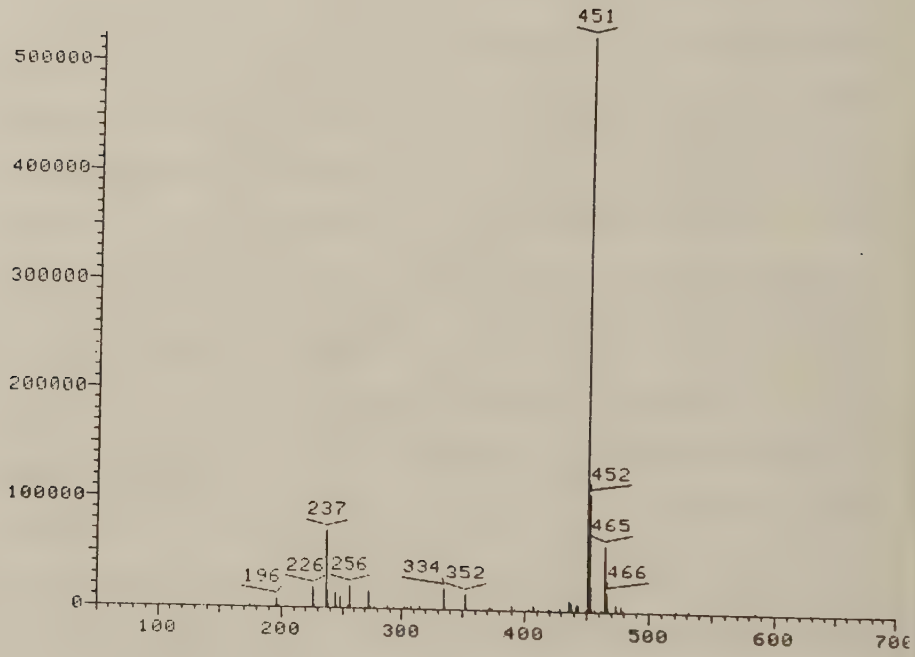

Abb. 25: FD-Massenspektrum von Rhizocticin III

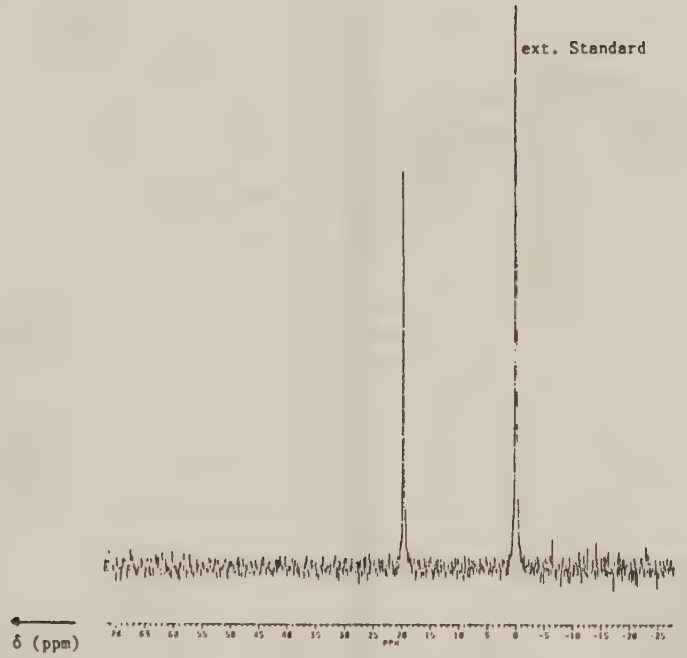

Abb. 26: ^{31}P-Kernresonanzspektrum von Rhizocticin III (BB-entkoppelt)

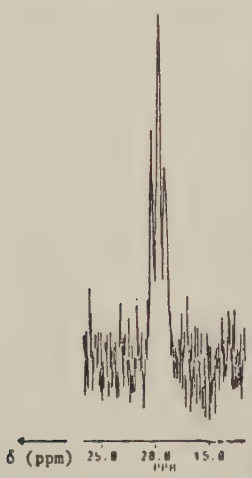

Abb. 27: ^{31}P-Kernresonanzspektrum (^{1}H-gekoppelt)

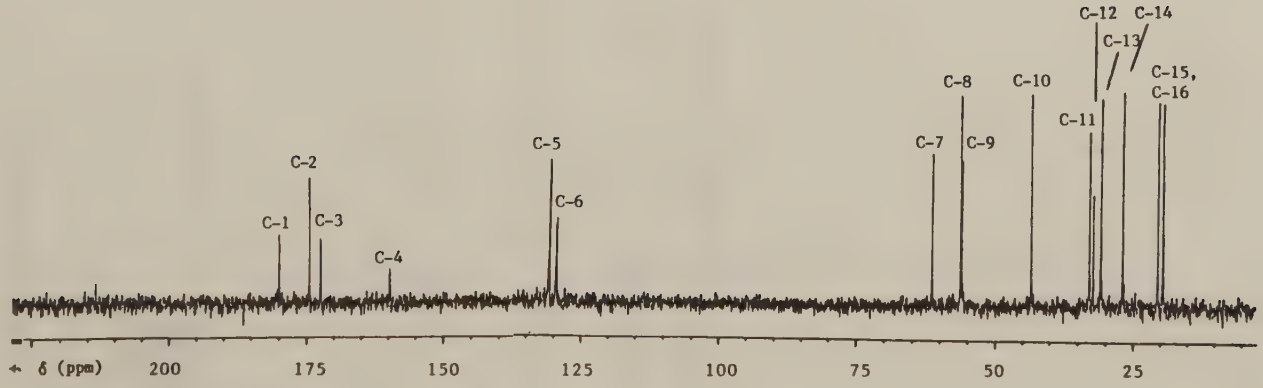

Abb. 28: ^{13}C-Kernresonanzspektrum von Rhizocticin III

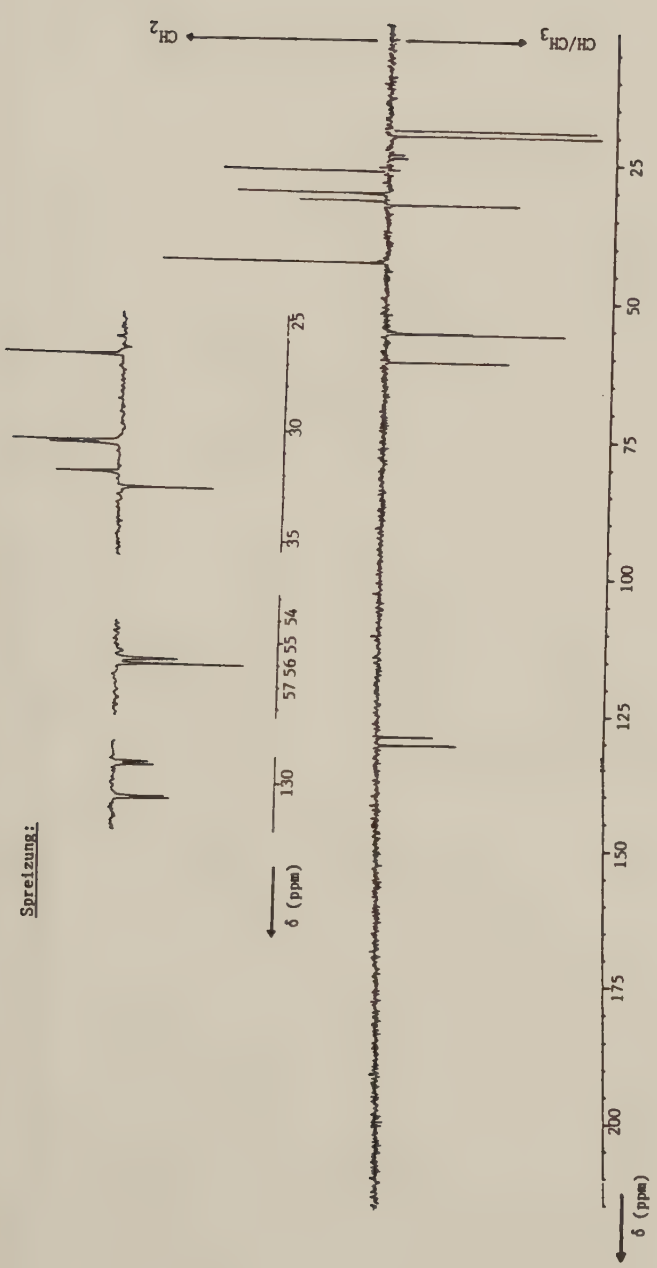

Abb. 29: ^{13}C-NMR-DEPT-Spektrum von Rhizocticin III

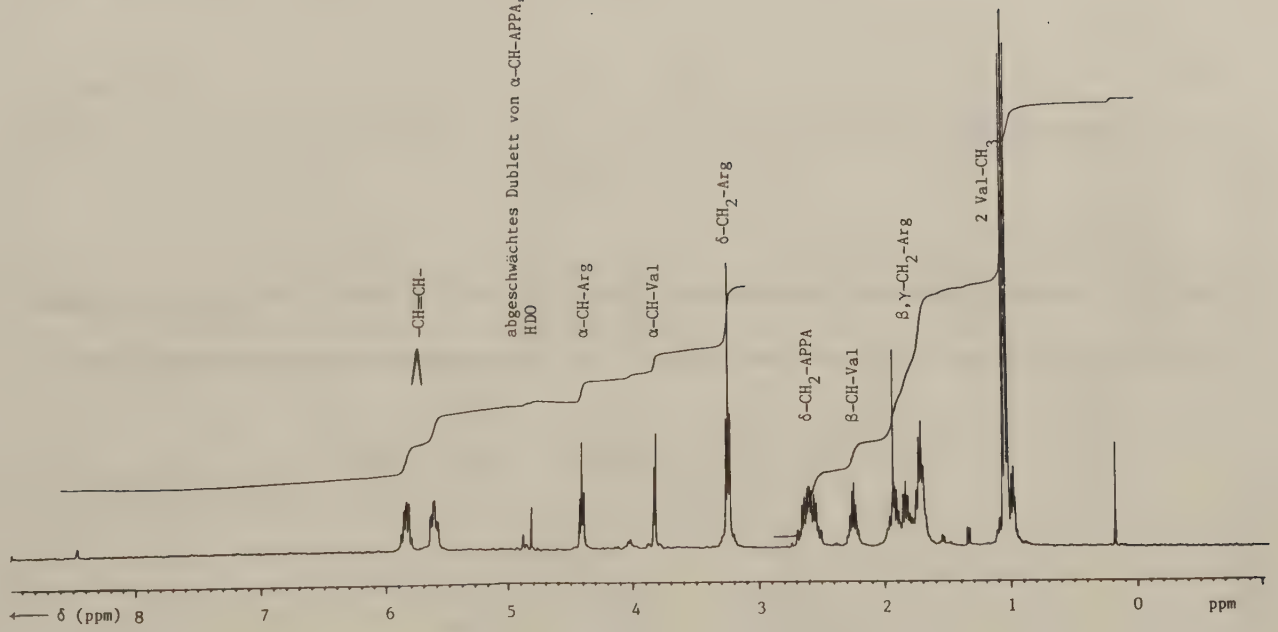

Abb. 30: ^{1}H-Kernresonanzspektrum von Rhizocticin III

Tabelle 14: ^{13}C-chemische Verschiebungen (in ppm) von Rhizocticin III

gemessene Werte	Multiplizäten
179.8	Arg C-1
56.2	Arg C-2
32.8	Arg C-3
26.9	Arg C-4
43.2	Arg C-5
174.3	APPA C-1
55.9	APPA C-2
129.4	APPA C-3 (Dublett 13.2 Hz)
130.7	APPA C-4 (Dublett 9.5 Hz)
31.5	APPA C-5 (Dublett 127 Hz)
172.2	Val C-1
61.3	Val C-2
30.8	Val C-3
20.5	Val C-4
19.5	Val C-5

Lebenslauf

Name, Vorname:	Kugler, Martin Witthold
Geburtsdatum:	05. Dezember 1958
Geburtsort:	Plochingen/Kreis Esslingen
Eltern:	Heinz Witthold Kugler und Gerlinde Kugler geb. Scheible
Schulbesuch:	
1966 bis 1969	Grundschule Wendlingen am Neckar
1969 bis 1978	Robert-Bosch-Gymnasium Wendlingen
12.05.1978	Abitur
Studium:	
ab WS 1978	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
27.10.1980	Vordiplom in Biologie, Tübingen
ab WS 1983	Diplomarbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Loeffler
02.07.1984	Biologie-Diplom (Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Biochemie, Genetik und Pflanzenphysiologie)
ab 01.08.1984	Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl I der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Loeffler. Gleichzeitig Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl Mikrobiologie I
September 1986	Abschluß der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation

Meine akademischen Lehrer waren:

R. Agerer, D. Ammermann, C.-F. Bardele, F.-W. Bentrup, W.-U. Berthold, W. Bessler, P. Blanz, V. Braun, D. Bunke, K. Dobat, K. Drumm, W. Engelmann, W. Engels, H. Felle, H.-P. Fiedler, E. Fischer, G. Forkmann, H. Frank, F. Gönnenwein, K.G. Grell, J. Guglielmi, A. Hager, W.G. Hantke, K. Heller, V. Hemleben, J.V. Höltje, C. Jönnson, G. Jung, , O. Klee, H. Kneifel, H. Krüger, H.-P. Lange, W. Loeffler, O. Lutz, D. Mecke, G. Mertens, G.F. Meyer, H. Netzel, F. Oberwinkler, W. Pinsker, H. Pommer, K. Poralla, H. Prillinger, W. Rähle, A. Rieker, B. Röttger, H. Schenk, W. Schlote, H. Schwarz, B. Schwemmle, A. Schwenk, H.U. Seitz, U. Seitz, W. Seyffert, D. Sperlich, R. Werner, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Wolf, A. Wörz, H. Zähner, A. Ziegler